

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Effet potentiel de la L-Arginine sur la biodisponibilité du monoxyde d'azote dans un modèle murin de néphropathie aux acides aristolochiques

Nziza, Nadège

Award date:
2015

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**EFFET POTENTIEL DE LA L-ARGININE SUR LA BIODISPONIBILITE DU
MONOXYDE D'AZOTE DANS UN MODELE MURIN DE
NEPHROPATHIE AUX ACIDES ARISTOLOCHIQUES**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Nadège NZIZA

Janvier 2015

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Effet potentiel de la L-Arginine sur la biodisponibilité du monoxyde d'azote dans un modèle murin de néphropathie aux acides aristolochiques

NZIZA Nadège

Résumé

La néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) est une atteinte rénale tubulointerstitielle progressive d'origine toxique ayant été identifiée pour la première fois en Belgique, en 1992. Elle est provoquée par des acides aristolochiques (AA) qui induisent de sévères lésions tubulaires associées à une infiltration de cellules inflammatoires. Cette néphropathie conduit rapidement vers un stade final d'insuffisance rénale chronique, caractérisé par le développement d'une atrophie et d'une fibrose tubulaires pouvant mener, à terme, au développement de lésions cancéreuses. De plus en plus de cas sont répertoriés dans le monde, mais la prévalence de cette maladie reste fortement sous-estimée. La NAA fait l'objet de nombreuses recherches et certaines ont permis de constater l'association de cette maladie à une diminution de la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO) intra-rénal, connu notamment pour son rôle de vasodilatateur puissant. Dès lors, nous avons tenté de comprendre l'impact éventuel d'un déséquilibre entre les agents vasoactifs sur la physiopathologie de la NAA. De plus, nous avons émis l'hypothèse que les AA pourraient être à l'origine d'une ischémie toxique au sein du tissu rénal.

Afin de poursuivre notre but et d'évaluer l'implication du NO dans la NAA, nous avons mis au point un modèle murin de NAA aiguë. Pour ce faire, des souris ont reçu, pendant 4 jours, des injections intrapéritonéales de AA (AAI ; 5 mg/kg). Certaines d'entre elles ont également reçu une administration *per os* de L-Arginine (L-Arg), un substrat des NO synthases.

Nous avons pu constater qu'une intoxication aux AA induisait une nécrose tubulaire aboutissant à une insuffisance rénale aiguë. En effet, les souris atteintes de NAA présentent une protéinurie massive, une glycosurie, une augmentation de l'excrétion fractionnelle de sodium et de la diurèse, reflétant ainsi des troubles de la réabsorption tubulaire. Ces observations nous ont permis de valider notre modèle de NAA, conformément à la littérature. Par la suite, nos résultats ont démontré qu'un traitement à la L-Arg permettait d'augmenter la biodisponibilité intra-rénale en NO, et que cette augmentation induisait une atténuation des lésions tubulaires ainsi qu'une amélioration de la réabsorption tubulaire. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure d'associer la NAA au développement d'une ischémie rénale toxique dans notre modèle. De nouvelles analyses sont donc requises afin de mieux comprendre par quels mécanismes le NO induit une protection du rein dans cette néphropathie.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: N. Caron

Remerciements

Avec cette aventure enrichissante et grandissante qui s'achève, je tiens tout d'abord à remercier Mme Nathalie Caron pour m'avoir reçue dans son laboratoire, merci pour ses explications, ses conseils et merci pour le temps consacré à mon travail.

Je remercie les membres du jury pour leur participation à l'évaluation de mon mémoire.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Ines, ma doctorante, qui m'a énormément aidée lors des corrections, merci d'avoir fait preuve de patience et de m'avoir guidée tout au long de mon mémoire. Merci pour tes nombreux conseils et tes explications, merci pour l'aide immense que tu m'as apportée. Je remercie également Anne-Emilie pour sa contribution à l'aboutissement de ce mémoire. Merci à toi Isabelle pour ton côté enthousiaste, pour ton aide durant les manipulations et pour toutes tes petites histoires qui mettent toujours de bonne humeur. Merci à vous Lucie et Virginie pour les quelques moments passés avec vous. Bien qu'ils aient été brefs, il n'a pas fallu longtemps pour se rendre compte que tu es une personne rayonnante Lucie, et qui respire la joie de vivre. Quant à toi Virginie, par ta douceur et ta gentillesse, il a vite été possible de voir que tu es quelqu'un de très agréable. Aussi, un tout grand merci à toi Vanessa. Cette année, tu pensais ne pas avoir ton mémorant à toi, mais tu as été, pour nous, plus que « la doctorante d'à côté à qui on peut poser quelques questions ». Tu étais là chaque fois qu'on avait besoin de toi, que nous te le demandions ou pas. Tu avais toujours une petite phrase rassurante et réconfortante en réserve. Tu ne le réalises peut-être pas, mais tu m'as aidée à avoir plus confiance en moi, à oser prendre des initiatives, et surtout à relativiser quand je fais une erreur. Merci d'avoir été à l'écoute. Mille mercis à toi Blanche, pour ses moments passés ensemble ! Merci pour ta façon d'être toujours positive, toute pétillante et toute souriante. Ta bonne humeur est réellement communicative et passer du temps avec toi n'en est que plus plaisant. Merci aussi à Clara pour ces brefs instants durant lesquels tu nous as fait profiter de ta compagnie. A vous toutes, je dis un grand merci pour tout ce que vous m'avez appris durant ce mémoire. Merci pour la contribution de chacune à cette bonne humeur qui règne dans le laboratoire. Vous avez été une équipe accueillante, chaleureuse et très agréable.

Et merci à Gabrielle qui a été une très bonne amie, mais pas seulement. Tu as également été une chef cuisto, un coach sportif personnel, une agence intérim,... Merci aussi pour toutes les fois où tu m'as rassurée. Même si tu n'as jamais su trouver les mots qu'il faut, ton attitude parlait toujours d'elle-même. Tu sais te montrer préoccupée par les soucis des autres, et là où on voit un problème, toi tu vois une solution. Merci pour tout Gaby ! Et je remercie aussi Damien, Dimitri, Delphine et Céline. Avec vous j'ai passé une dernière année formidable. Mon seul regret est de ne pas vous avoir connus plus tôt.

Merci à mes tous petits Laetitia, Cecilia, Graciella et Iris. Merci d'avoir été toujours là pour moi, d'avoir été à l'écoute. J'ai toujours pu compter sur vous, que ce soit dans les moments difficiles ou pour faire la fête. Merci pour tous les délires, les fous rires et les moments de confiance. Vous êtes ma petite famille de Belgique et, sans vous, mes études dans ce pays n'auraient jamais pu être remplies d'autant d'émotions et de si beaux souvenirs.

Je termine en remerciant de tout cœur ma famille, et plus particulièrement Mamita, Tantine Gisèle et Tantine Tina. Vous avez été comme des mères pour moi. Votre affection et vos paroles encourageantes et réconfortantes m'ont aidée à surmonter de nombreuses épreuves. Je remercie aussi mes deux adorables petites sœurs, Linda et Khadidja, et mon petit Kany aussi. Merci pour tous les beaux moments que nous avons partagés. Vos côtés espiègle, touchant et tellement attachant m'ont apportés beaucoup de réconfort toutes les fois où j'en avais le plus besoin. Et enfin, je termine avec toi Maman. Si je devais te remercier pour tout ce que tu as fait et tout ce que tu représentes pour moi, il me faudrait plus de pages que ce mémoire. Je vais donc surtout te remercier pour tous tes conseils et ton soutien permanent. Tu as toujours trouvé exactement les mots qu'il faut et je te remercie sincèrement pour avoir toujours cru en moi, même quand moi je n'y croyais plus. Tu as été une meilleure amie, une confidente, un modèle et je te remercie non seulement pour m'avoir permis de réaliser les études qui me plaisent, mais aussi pour m'avoir donné la force d'y croire et d'aller jusqu'au bout.

Liste des abréviations

AA	Acides aristolochiques
ADH	Hormone antidiurétique
ADMA	Asymmetric dimethylarginine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
α -GST	α -glutathione <i>S</i> -transferase
AMPK	Adénosine monophosphate protéine kinase
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BH ₄	Tetrahydro-L-biopterine
BMP-7	Bone morphogenetic protein 7
Ca ⁺	Calcium
CETP	Cellules épithéliales tubulaires proximales
Ctl	Contrôle
CX ₃ CL1	Fractalkine
dA-AAI	7-(déoxyadénosine-N6-yl)aristolactame I
dA-AAII	7-(déoxyadénosine-N6-yl)aristolactame II
DFG	Débit de filtration glomérulaire
dG-AAI	7-(déoxyguanosine-N2-yl)aristolactame I
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ET-1	Endothéline-1
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
EPO	Erythropoïétine
ET-1	Endothéline-1
FAD	Flavine adénine mononucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GLUT1	Transporteur de glucose 1
h	Heure
HB-EGF	Heparine binding Epidermal growth factor
HIF	Hypoxia inducible factor
Hsp	Heat-shock proteins
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
i.p.	Intra-péritonéal
IR	Insuffisance rénale
ICR	Insuffisance rénale chronique
iNOS	Induced nitric oxide synthase
IRA	Insuffisance rénale aiguë
ISOM	Inner stripe of the outer medulla
JG12	Aminopeptidase P
Kg	Kilogrammes
L	Litres
LAP	Leucine aminopeptidase
L-Arg	L-arginine
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester

L-NIL	N ⁶ -(1-iminoethyl)-L-lysine
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mEq	Milliéquivalent
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mU	Milliunité
Na ⁺	Sodium
NAA	Néphropathie aux acides aristolochiques
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NAG	N-acetyl-β-D-glucosaminidase
NEB	Néphropathie endémique aux Balkans
NEP	Neutral endopeptidase
nm	Nanomètre
NMA	N ^G -monométhyl-L-arginine
nNOS	Neural nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NOx	Nitrites/Nitrates
NS	Non significatif
NTA	Nécrose tubulaire aiguë
OAT	Organic anion transporter
OCT	Organic cation transporter
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSOM	Outer stripe of the outer medulla
OUU	Obstruction urétrale unilatérale
PAS	Periodic acid Schiff
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDK	Phosphoglycérate kinase-1
pg	Picogramme
P	Plasma
PVDF	Polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Tour par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	Tétraméthylethylènediamine
U	Urine
V	Diurèse
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	Versus
μ	Micro

Table des matières

INTRODUCTION

1. Généralités sur le rein	1
1.1. Anatomie et fonctions rénales	1
1.2. Physiopathologie	4
1.2.1. Perturbations d'origines toxique et ischémique	4
1.2.2. Insuffisance rénale	5
2. Néphropathie aux acides aristolochiques	7
2.1. Généralités	7
2.2. Acides aristolochiques	8
2.3. Effets cytotoxiques	10
2.3.1. Cancérogenèse	10
2.3.2. Néphrotoxicité	10
2.4. Modèles expérimentaux de la NAA	11
3. Monoxyde d'azote (NO)	12
3.1. Généralités	12
3.2. Synthèse du NO	12
3.3. Rôles du NO	13
3.4. Le NO intrarénal	14
3.5. Modulateurs pharmacologiques	15
4. Objectifs du travail	16

MATERIEL ET METHODES

1. Protocole expérimental	17
1.1. Animaux	17
1.2. Traitements	17
2. Echantillons biologiques	17
3. Approches analytiques	19

3.1.	Mesure des concentrations urinaires et plasmatiques en Na ⁺ et K ⁺	19
3.2.	Mesure de l'osmolarité urinaire.....	19
3.3.	Mesure des concentrations en glucose urinaire	20
3.4.	Quantification de la protéinurie.....	20
3.5.	Détermination des concentrations en créatinine plasmatique et urinaire.....	20
3.6.	Dosage colorimétrique des nitrates/nitrites urinaires	20
3.7.	Dosage de la concentration urinaire en NAG.....	21
3.8.	Western Blot.....	21
3.9.	Détermination des concentrations rénales en MCP-1	23
3.10.	PCR quantitative en temps réel.....	24
4.	Analyses morphologiques	25
4.1.	Coloration PAS (Periodic Acid Schiff).....	25
4.2.	Immunomarquage.....	26
5.	Analyses statistiques.....	27

RESULTATS

1.	Observations générales.....	29
2.	Fonction rénale	29
2.1.	Capacité excrétoire.....	30
2.2.	Altérations fonctionnelles	30
3.	Caractérisation des lésions tubulaires et prolifération cellulaire	32
3.1.	Analyses histologiques	32
3.2.	Evaluation du processus de prolifération cellulaire	34
4.	Etude de l'inflammation.....	36
5.	Monoxyde d'azote et NO synthases	36
5.1.	Excrétion des métabolites du NO.....	36
5.2.	Expression génique de eNOS et de iNOS.....	37
6.	Caractérisation du compartiment vasculaire	37
7.	Evaluation de l'hypoxie intra-rénale.....	39
7.1.	Expressions protéique et génique de HIF-1α	39
7.2.	Expression génique de HIF2α	40

7.3. Expression génique de VEGF	40
---------------------------------------	----

DISCUSSION

1. Etude des altérations morpho-fonctionnelles rénales	41
2. Etude de l'ischémie rénale	46
3. Conclusion et perspectives	50

BIBLIOGRAPHIE

Introduction

1. Généralités sur le rein

1.1. Anatomie et fonctions rénales

L'appareil urinaire dont la fonction principale est de produire, stocker et éliminer l'urine est composé de deux reins, deux uretères ainsi que d'une vessie et d'un urètre (Figure 1). Chez l'être humain, les reins comportent deux parties distinctes, à savoir le cortex et la médullaire (Figure 2). Le cortex correspond à la partie externe du rein formée de colonnes de Bertin et entourée d'une capsule. La médullaire est quant à elle composée de structures coniques appelées pyramides médullaires dont les bases font face au cortex tandis que les sommets, dénommés papilles rénales, sont dirigés vers le système collecteur d'urine. De façon générale, la médullaire contient une partie interne et une externe, elle-même subdivisée en OSOM (*outer stripe of the outer medulla*) situé contre le cortex et en ISOM (*inner stripe of the outer medulla*) (Figure 2) (Tisher and Brenner, 1994).

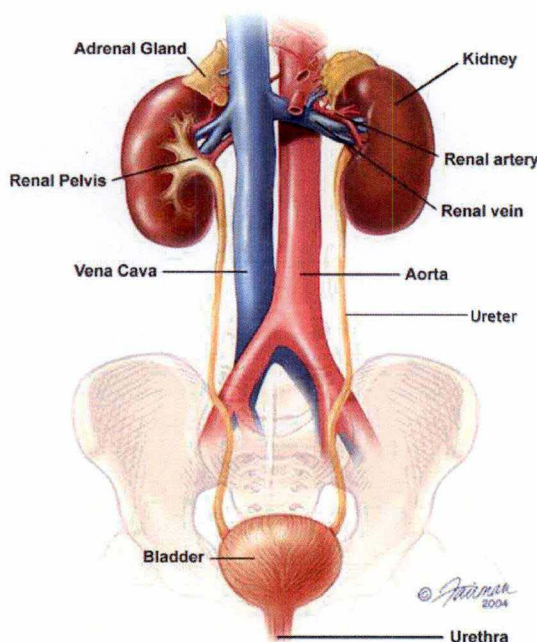


Figure 1 : Schéma général de l'appareil urinaire.
http://www.aboutcancer.com/prostate_anatomy.htm

D'un point de vue fonctionnel, les reins jouent un rôle essentiel dans la régulation de la circulation sanguine, de l'équilibre acido-basique et hydro-électrolytique ainsi que dans la production d'hormones. En effet, via l'urine qu'il produit, le rein contrôle l'excrétion de certaines substances plasmatiques telles que les déchets du métabolisme et les substances exogènes afin d'assurer le maintien de l'homéostasie du milieu intérieur. Simultanément, des molécules d'eau sont éliminées et la quantité excrétée varie en fonction du volume de liquide extracellulaire et de la pression artérielle. Enfin, le rein a une fonction endocrinienne car il synthétise notamment l'érythropoïétine qui est une cytokine intervenant dans l'érythropoïèse. De plus, il sécrète la rénine et régule ainsi l'homéostasie du sodium ainsi que la pression artérielle. Il est également impliqué dans l'activation de la vitamine D3 qui joue alors un rôle dans l'équilibre calcique (Pitts and Masson, 1976).

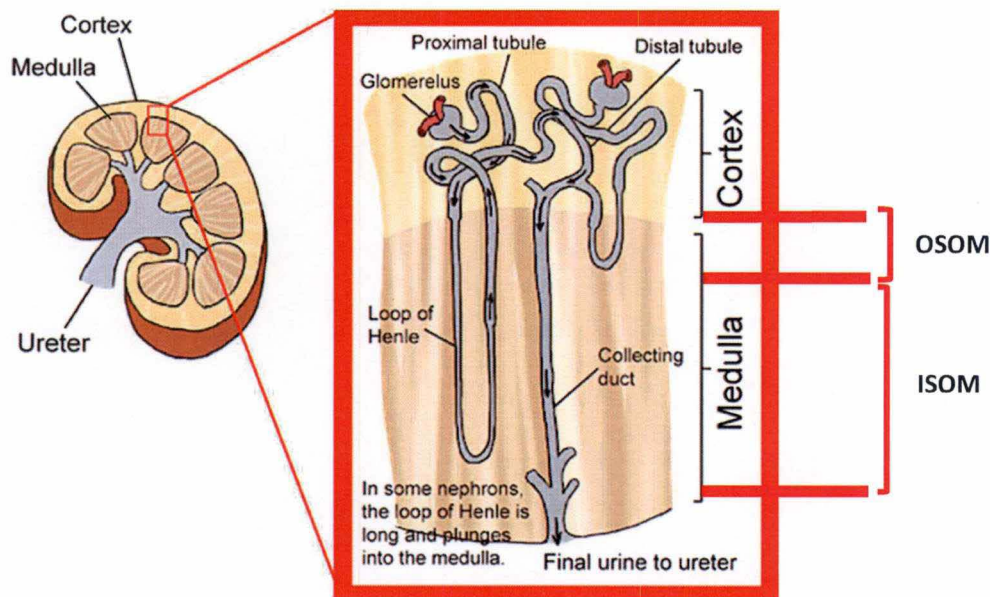


Figure 2 : Structure du rein. ISOM : Inner stripe of the outer medulla; OSOM : Outer stripe of the outer medulla. Modifié d'après <http://www.shmoop.com/animal-digestion/kidney.html>

L'unité fonctionnelle du rein correspond aux néphrons qui sont environ au nombre de 1×10^6 dans un rein humain adulte. Ces structures sont soit presque entièrement localisées dans la partie corticale, soit présentant des prolongements allant jusqu'à la partie interne de la médullaire. Il s'agit respectivement des néphrons corticaux et juxtaglomérulaires, les premiers représentant 80% du nombre totale de néphrons. Ces unités sont divisées en plusieurs segments, chacun exerçant une fonction précise (Figure 3). La partie initiale est une structure creuse nommée capsule de Bowman au sein de laquelle se trouve un réseau de capillaires glomérulaires. C'est à ce niveau que la première fonction rénale est effectuée, à savoir l'ultrafiltration du plasma. En effet, une artériole afférente délivre le sang aux capillaires glomérulaires dont l'endothélium est fusionné à l'épithélium de la capsule de Bowman. Ces capillaires convergent ensuite au niveau du pôle vasculaire et quittent le glomérule en formant une artériole efférente. L'ultrafiltration sanguine a lieu lorsque des composants sanguins traversent l'endothélium mince et fenestré des capillaires, puis l'épaisse membrane basale glomérulaire et enfin les podocytes qui sont des cellules épithéliales. Ces trois structures constituent la barrière de filtration glomérulaire au niveau de laquelle se situent des glycoprotéines polyanioniques permettant de sélectionner les molécules à filtrer. L'ultrafiltrat quitte ensuite le glomérule par le pôle urinaire et rejoint le compartiment tubulaire. Chaque tube est composé d'un ensemble de segments qui s'enchaînent et qui correspondent successivement au tubule proximal, suivi de l'anse de Henlé, du tubule distal, du tube connecteur et enfin du tube collecteur. Ces segments ont tous une morphologie différente qui est associée à leur fonction particulière (Stevens and Lowe, 1997).

En ce qui concerne les tubules, ils sont impliqués dans la régulation de la concentration et de la composition chimique du sang. Dans le cadre de ce mémoire, une attention particulière a été portée au tubule proximal au niveau duquel a lieu une réabsorption de 60 à 65% du filtrat glomérulaire. Cette réabsorption prend place grâce à un co-transport dont la principale force motrice est le transport actif de sodium (Na^+), créant ainsi un gradient électro-chimique. Ces tubules sont composés de deux parties, une première est contournée (*pars convoluta*), la

deuxième est droite (*pars recta*). Ils sont également divisés en trois segments à savoir les segments S1, S2 et S3. Les deux premiers se situent au niveau du tubule proximal contourné, le dernier au niveau de la partie droite. Les cellules épithéliales des tubules proximaux (CETP) sont cubiques ou cylindriques en fonction du segment dans lequel elles se situent. Leur noyau est en position centrale et celles possèdent une bordure en brosse qui correspond à un ensemble de microvillosités très serrées. Ces structures permettent d'augmenter la surface de réabsorption des composés filtrés qui se retrouvent alors dans l'espace extracellulaire puis dans des capillaires péri-tubulaires. Les CETP sont riches en organites tels que des mitochondries qui apportent de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) qui est indispensable aux processus de réabsorption via des transports actifs. Ces cellules réabsorbent ainsi 60% des électrolytes et de l'eau filtrés ainsi que la quasi-totalité du glucose et des acides aminés. De façon générale, les tubules sont également impliqués dans des phénomènes de sécrétion. En effet, ils participent au transport de solutions de l'interstitium vers la lumière tubulaire. Par exemple, le segment S3 favorise la sécrétion d'anions organiques tels que des xénobiotiques et des médicaments grâce à la présence de canaux spécialisés pour le transport de ces anions organiques (*organic anion transporter*, OAT).

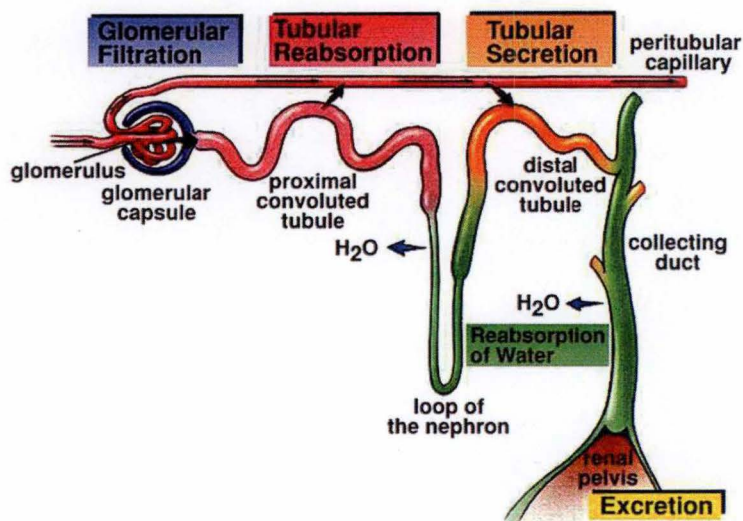


Figure 3 : Les différentes parties du néphron et leur implication dans la formation de l'urine.
(Gyuton et al., 2010)

Ces fonctions rénales sont facilitées par l'importance du système vasculaire, 25% du débit cardiaque étant distribués au tissu rénal. Après plusieurs divisions, les vaisseaux sanguins arrivent au niveau des glomérules sous forme d'artérioles afférentes et en sortent sous forme d'artérioles efférentes pour ensuite former un nouveau réseau de capillaires autour des tubules corticaux. Il s'agit des capillaires péri-tubulaires corticaux qui emmènent l'eau et les solutés réabsorbés par les tubules vers la circulation générale. En ce qui concerne les artérioles efférentes appartenant aux néphrons juxtaglomérulaires, le système est quelque peu différent. En effet, elles se dirigent verticalement vers la médulla et se divisent en longs vaisseaux nommés *vasa recta* qui possèdent une paroi mince. Ces vaisseaux entourent les anses de Henlé et interviennent dans les échanges d'ions et de liquides au niveau de la médulla afin d'optimiser le mécanisme de concentration des urines. Contrairement aux capillaires du peloton glomérulaire, ces vaisseaux participent aux échanges de gaz et apportent de l'oxygène aux zones corticales et médullaires qui possèdent une activité métabolique importante (Stevens and Lowe, 1997).

1.2. Physiopathologie

Afin d'effectuer correctement ses différentes fonctions physiologiques, le rein nécessite la préservation de ses structures pour pouvoir garantir une interaction optimale entre les tubules et les vaisseaux. Cette préservation dépend fortement de l'intégrité des vaisseaux artériels et des capillaires qui apportent l'oxygène aux différents segments du néphron. Malgré le fait qu'il reçoive 20 à 25% du débit cardiaque, le rein est un organe très sensible aux conditions d'hypoperfusion. En fonction de sa perfusion et de sa consommation en oxygène, chaque zone présente une vulnérabilité particulière à la privation en oxygène. Les tubules, par exemple, qui ont une consommation métabolique importante afin d'assurer la réabsorption active du sodium (Na^+), sont donc très sensibles à une réduction de l'apport sanguin. Les causes principales de lésions tubulaires sont les atteintes d'origines toxiques et ischémiques (Basile et al., 2012).

1.2.1. Perturbations d'origines toxique et ischémique

Les différentes fonctions rénales sont telles que cet organe est régulièrement exposé à des substances toxiques. En effet, lors des phénomènes de réabsorption et de sécrétion, une concentration de produits du métabolisme et de xénobiotiques a lieu au niveau des tubules et de l'interstitium. De plus, une saturation en substances chimiques faiblement liposolubles entraîne la formation de cristaux à l'intérieur des tubules. Tous ces facteurs sont à l'origine de lésions et parfois même d'oblitérations tubulaires. Certains segments sont plus atteints que d'autres, notamment en fonction de la quantité d'enzymes de biotransformation pouvant induire la formation de produits intermédiaires toxiques. Les systèmes de transport des cations et des anions organiques interviennent également dans la sensibilité des tubes rénaux aux substances toxiques. Ces systèmes dépendent d'une part de la présence de transporteurs OAT cités précédemment. Onze membres de cette famille ont été identifiés à ce jour, sept d'entre eux étant exprimés dans le rein. Les OAT1, OAT2 et OAT3 ont été identifiés dans la partie basolatérale de la membrane des tubules proximaux (Burckhardt and Wolff, 2000). Leur rôle est d'excréter les substances exogènes telles que des nucléotides cycliques et des prostaglandines, ainsi que des médicaments et des mycotoxines comme l'ochratoxine A. Les autres OAT sont situés au niveau apical des cellules tubulaires et leur fonction n'est pas encore bien déterminée (Dickman et al., 2011). La seconde famille de transporteurs qui a été identifiée correspond à celle chargée du transport des cations organiques (OCT). Les OCT1 induisent la sécrétion de substances endogènes (progestérone, dopamine, choline,...), de médicaments et de composés toxiques (nicotine, cyanine,...). Une fois de plus, les tubules proximaux sont la cible principale des molécules toxiques car ils expriment de nombreux OCT dans leurs cellules (Tarloff et al., 2005).

Par ailleurs, le rein peut être confronté à des situations d'hypoperfusion qui induisent le développement d'une ischémie tissulaire. Une diminution du flux sanguin s'accompagne d'un déficit en oxygène et en ATP. Un tel phénomène peut avoir des répercussions autant sur les tubules qu'au niveau du compartiment vasculaire (Sutton, 2009). Pour y faire face, le rein dispose de plusieurs systèmes de régulation. En effet, cet organe peut induire la synthèse de médiateurs afin de moduler le tonus vasomoteur à différents niveaux de la circulation rénale. Nous pouvons ainsi citer le monoxyde d'azote (NO) ou encore l'adénosine. En ce qui concerne le NO, il exerce un effet vasodilatateur dans la médullaire et permet d'annuler les effets de certains vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, la noradrénaline et la vasopressine. Ce médiateur régule aussi la réabsorption de NaCl afin de réduire l'activité métabolique.

L'adénosine, quant à elle, est un vasoconstricteur qui intervient dans le rétrocontrôle tubuloglomérulaire. Pour ce faire, elle inhibe la réabsorption de Na^+ au niveau de l'anse de Henlé, entraînant ainsi une augmentation de la concentration en cet ion dans la *macula densa*. Cette dernière représente un ensemble de cellules spécialisées de la branche ascendante de l'anse de Henlé dont le rôle est de réagir aux changements de concentration en NaCl dans la lumière tubulaire. Lorsqu'elle perçoit une augmentation de la concentration sodée, elle induit une vasoconstriction de l'artériole afférente et donc une baisse de la filtration. Ainsi, la charge électrolytique à réabsorber est amoindrie et la dépense énergétique aussi. La libération locale de ces médiateurs régule donc le flux sanguin et améliore l'oxygénation, protégeant ainsi les structures rénales. D'autres médiateurs agissent de concert avec ceux-ci, notamment des *Heat-shock proteins* (Hsp), l'hormone antidiurétique (ADH) et la prostaglandine E_2 .

L'hypoperfusion a également des conséquences au niveau de mécanismes transcriptionnels. Un acteur important de la réponse cellulaire à l'hypoxie est le facteur inductible à l'hypoxie (HIF). Cette protéine possède deux sous-unités, une α sensible à l'oxygène et une β qui est constitutive. Il existe trois isoformes de la sous-unité α , donnant ainsi HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . La première est principalement exprimée dans les cellules tubulaires et interstitielles, la seconde dans les cellules endothéliales, glomérulaires et les fibroblastes. La troisième isoforme est encore peu étudiée (Heddleston et al., 2010). HIF est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules en conditions d'hypoxie et est dégradé en normoxie. Lorsqu'il entre dans le noyau, il induit la transcription de gènes impliqués dans la survie ou la mort cellulaire, dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse, la régulation du pH, le tonus vasculaire ou encore le métabolisme du glucose. Parmi ces gènes se trouvent ceux codant pour le transporteur de glucose 1 (GLUT1), la phosphoglycérate kinase-1 (PDK), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et l'érythropoïétine (EPO) (Jacob, 2007).

1.2.2. Insuffisance rénale

Des perturbations d'origines toxiques ou ischémiques peuvent conduire à une nécrose tubulaire aiguë (NTA) et à des lésions des cellules endothéliales, entravant ainsi davantage la microcirculation. Les atteintes rénales aiguës induisent une réponse en quatre phases (Figure 4) (Basile et al., 2012). La première correspond à une phase d'initiation caractérisée par des lésions cellulaires importantes et d'une obstruction tubulaire. La persistance de perturbations vasculaires ainsi que d'acteurs de l'inflammation induit l'installation d'une phase d'extension. Peu à peu, une réparation tissulaire est mise en place, avec une prolifération, une migration et une réorganisation cellulaire. Il s'agit de la phase de maintenance durant laquelle les fonctions rénales sont progressivement retrouvées jusqu'à arriver à la dernière phase qui correspond à la guérison.

Les lésions des structures rénales sont accompagnées d'une perte progressive ou ponctuelle des fonctions de cet organe. On parle alors d'insuffisance rénale (IR). Cette maladie se traduit par une incapacité des reins à épurer le plasma sanguin, ce qui induit une rétention des déchets métaboliques dans le sang, particulièrement les déchets azotés, l'urée et la créatinine. Les lésions tubulaires sont également accompagnées d'une diminution rapide du débit de filtration glomérulaire (DFG) ainsi que d'une importante excrétion urinaire de protéines dont la réabsorption est entravée. Cette protéinurie varie en fonction des lésions et permet de détecter la présence d'altérations de façon précoce, c'est-à-dire avant que le moindre changement significatif de DFG n'ait été détecté.

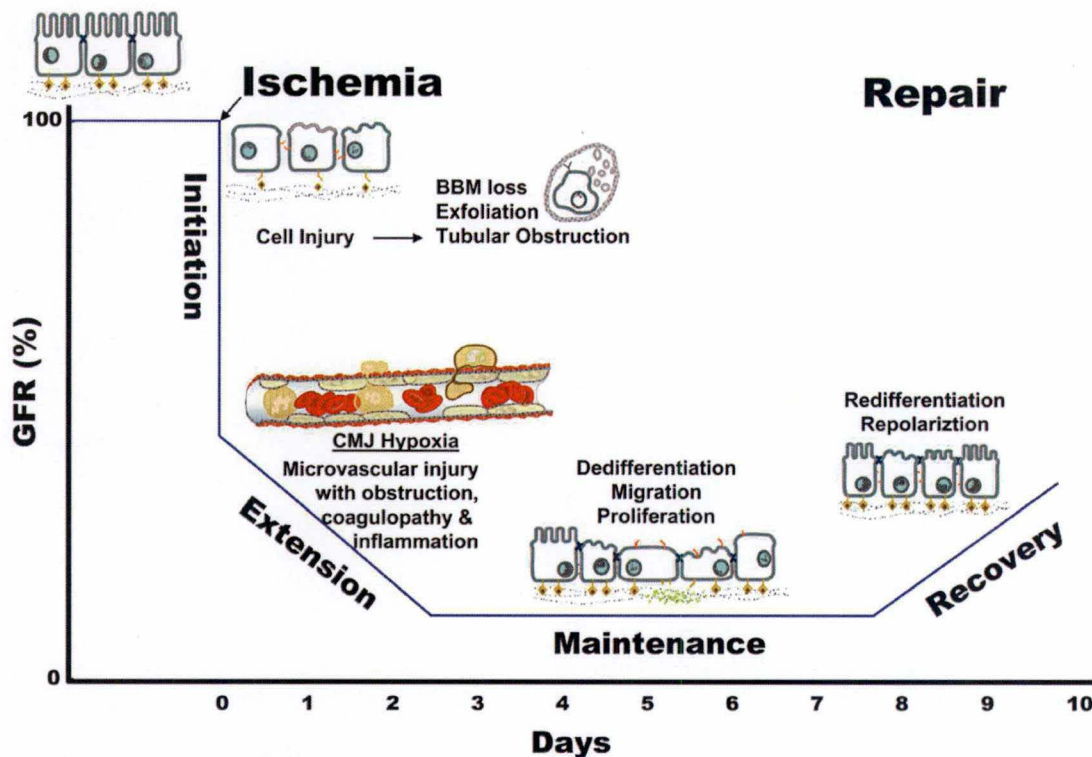


Figure 4 : Illustration des phases cliniques survenant durant les atteintes rénales aiguës et l'évolution des fonctions rénales, représentées ici par le débit de filtration glomérulaire. (Basile et al., 2012)

L'IR peut être soit aiguë (IRA), soit chronique (IRC). L'IRA correspond à un arrêt brutal de la fonction rénale. Dans la plupart des cas, cette phase est réversible et mis à part quelques séquelles mineures, le rein recouvre ses fonctions (Lameire and Vanholder, 2004). Toutefois, un épisode d'IRA peut déterminer une susceptibilité accrue de développement d'une IRC (Jacob, 2007). Lorsque les atteintes rénales progressent, une insuffisance chronique (IRC) finit par se développer. Elle correspond à la détérioration progressive des fonctions rénales causée par une altération des glomérules, des lésions endothéliales menant à l'épaississement des vaisseaux et/ou une atrophie tubulaire. Les dommages sont alors irréversibles et, sans traitement, l'IRC peut évoluer vers le coma ou la mort (Stevens and Lowe, 1997).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à un cas particulier de néphropathie induite par des toxines. Il s'agit de la néphropathie aux acides aristolochiques (AA) qui sont contenus dans des plantes chinoises. Ces toxines sont responsables de lésions tubulo-interstitielles induisant une insuffisance rénale chronique évoluant rapidement vers le stade terminal. L'exposition aux AA peut également aboutir au développement de tumeurs des voies urinaires.

2. Néphropathie aux acides aristolochiques

2.1. Généralités

La néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) a été identifiée pour la première fois en Belgique, en 1992. En effet, plusieurs cas simultanés d'insuffisance rénale sévère chez des femmes ont permis d'associer cette maladie à des pilules amaigrissantes que ces patientes avaient ingérées. Ces pilules censées contenir des extraits de la plante chinoise *Stephania tetrandra* possédaient en réalité ceux d'une plante nommée *Aristolochia fangchi* (Figure 5) (Vanherweghem et al., 1993) (Nortier et al., 1997) (Debelle et al., 2008). Cette substitution est due à la ressemblance, en médecine chinoise, des noms de ces plantes qui appartiennent à la même famille thérapeutique (*Han fang-ji* en pin yin pour *Stephania tetrandra*, *Guang fang-ji* pour *Aristolochia fangchi*). Tandis que les tétrandrines, alcaloïdes de *Stephania*, sont inoffensifs, les AA contenus dans les *Aristolochia* ont des effets néphrotoxiques et cancérogènes. L'exposition aux AA a été confirmée par l'identification d'adduits d'ADN formés par des aristolactames qui sont des métabolites actifs dérivés des AA (Ng et al., 1998) (Cronin et al., 2002).



Figure 5 : Acides aristolochiques. A) Coupe transversale d'une racine d'*Aristolochie* et d'une gélule amaigrissante contenant des AA. B) *Aristolochia clematis* dans un champ de céréales situé dans le bassin du Danube. C) Représentation de la molécule d'AA. (Debelle et al., 2008)

L'analyse clinique des patientes atteintes de NAA a révélé pour quelques-unes d'entre elles un syndrome de Fanconi, trouble au niveau de la fonction tubulaire (Izumotani et al., 1993) (Hong et al., 2006). Dans la majorité des cas, l'insuffisance rénale est rapidement devenue chronique et 70% des patientes ont développé une insuffisance terminale (Vanherweghem et al., 1993) (Cosyns et al., 1994). Une dialyse et/ou une transplantation rénale ont alors été indispensables. Cette maladie a très rarement pu être détectée au stade aigu, sauf fortuitement lors d'examens sanguins de routine. Seuls deux rapports indiquent une atteinte tubulaire aiguë caractérisée par des nécroses tubulaires (Diamond and Pallone, 1994) (Yang et al., 2007). Même après l'arrêt de l'intoxication aux AA, la détérioration de la fonction rénale se poursuit.

De façon générale, des études cliniques ont montré que l'insuffisance rénale induite par les AA s'accompagne d'une anémie et d'une glycosurie (Kabanda et al., 1995) (Debelle et al., 2002) (Liu et al., 2003). De plus, des protéines de faible poids moléculaire sont abondamment excrétées. C'est le cas des β 2- et α 1-microglobulines et des protéines des cellules de Clara qui devraient être réabsorbées et dont la présence dans les urines témoigne d'une atteinte tubulaire (Nortier et al., 1997). Cette constatation est renforcée par la détection de l'enzymurie de NEP (*Neutral endopeptidase*) qui est une protéine abondamment exprimée au niveau de la bordure en brosse des segments S3 des tubules proximaux.

En ce qui concerne l'examen histologique effectué sur des échantillons humains, il met en évidence des reins dont la taille est réduite et dont les contours sont symétriques et réguliers (Depierreux et al., 1994). De plus, une fibrose tubulo-interstitielle est détectable, ainsi qu'une atrophie tubulaire marquée. Les glomérules sont, quant à eux, relativement épargnés. Un infiltrat lymphocytaire est dans la plupart des cas observé dans l'interstitium, à proximité des zones lésées (Pozdzik et al., 2010). De nombreuses tumeurs de l'urothélium peuvent également être visibles (Nortier and Vanherweghem, 2002).

Depuis que la NAA a été identifiée dans les années 90, de nombreux cas ont été recensés dans d'autres pays d'Europe tels que la France, l'Espagne, le Royaume-Uni et l'Allemagne, ainsi qu'aux Etats-Unis. De plus en plus de cas sont mis en évidence en Asie car de nombreux ingrédients suspectés de contenir des AA font partie de la médecine traditionnelle. Enfin, une maladie similaire nommée néphropathie endémique des Balkans (NEB) a été identifiée en Bosnie, Roumanie, Serbie, Croatie et Bulgarie (Debelle et al., 2008) (Stiborova et al., 2008a). Dans ce cas, elle est causée par *Aristolochia clematis*, riche en AA, qui se retrouve mélangée par inadvertance à la farine de blé. L'incidence réelle de cette atteinte rénale est encore inconnue et sûrement sous-estimée. Pourtant, elle représente un certain impact social, médical et économique (Yang et al., 2007) (Jelakovic et al., 2013). En effet, elle est classée dans le groupe I des cancérogènes par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (*Food and Drug Administration*) et par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il y a dès lors une nécessité d'analyser plus en profondeur cette néphropathie afin d'en comprendre les mécanismes pathologiques et d'élaborer des thérapies adaptées.

2.2. Acides aristolochiques

Les AA ($C_{17}H_{11}NO_7$) sont des acides carboxyliques nitrophénanthrènes du groupe des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ils sont présents chez des herbacées de la famille des *Aristolochiacées* dont font partie près de 500 espèces de plantes. La teneur en acides varie en fonction de l'espèce, de la saison et est particulièrement importante au niveau des racines. Les espèces qui nous intéressent ici correspondent à celles du genre *Aristolochia* composées principalement d'AAI (8-méthoxy-6-nitrophenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylique) et AAII (6-nitrophenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylique) (Stiborova et al., 2008a), deux acides fortement similaires autant dans leur structure que dans leurs effets néphrotoxiques.

Ces acides ont été retrouvés dans de nombreux organes tels que la vessie, l'estomac, le rein, les intestins, le foie, les poumons ou encore la rate (Schmeiser et al., 1988) (Dong et al., 2006) (Shibutani et al., 2010). Après leur entrée dans les cellules par simple diffusion ou via les OAT (Dickman et al., 2011) (Baudoux et al., 2012), les AA subissent une nitroréduction dont les différentes étapes ne sont pas encore parfaitement connues. Différentes enzymes hépatiques et rénales ont toutefois pu être identifiées. Il s'agit du cytochrome P450(CYP)1A2 situé dans les microsomes et le cytoplasme des hépatocytes. Le CYP1A1 agit également dans le foie mais dans une moindre mesure. Dans le rein, c'est la NADPH/CYP réductase qui active les AA à l'intérieur des microcosmes. D'autres enzymes présentes dans les cytoplasmes des cellules hépatiques et rénales sont impliquées dans l'activation de ces acides mais avec un impact mineur. Il s'agit de la NAD(P)H/quinone oxydo-réductase et la xanthine oxydase. Les AA sont alors métabolisés en aristolactames I et II, en fonction de leur origine (AAI ou AAII) (Chan et al., 2007) (Stiborova et al., 2008a).

Au cours de la nitroréduction, l'ion N-acylnitrenium cyclique est formé, celui-ci comportant une délocalisation de charge positive. Cette charge lui confère la capacité à se lier

de façon covalente avec les groupes amino exo-cycliques des bases puriques de l'ADN, formant ainsi des adduits d'ADN. Les adduits les plus couramment observés au niveau des tissus rénaux et des uretères des patients et des animaux intoxiqués aux AA correspondent aux 7-(déoxyadénosine-N6-yl) aristolactame I (dA-AAI), 7-(déoxyguanosine-N2-yl) aristolactame I (dG-AAI) et 7-(déoxyadénosine-N6-yl) aristolactame II (dA-AAII) (Figure 6) (Krumbiegel et al., 1987). Ces adduits sont impliqués dans des processus de tumorigenèse (Debelle et al., 2008).

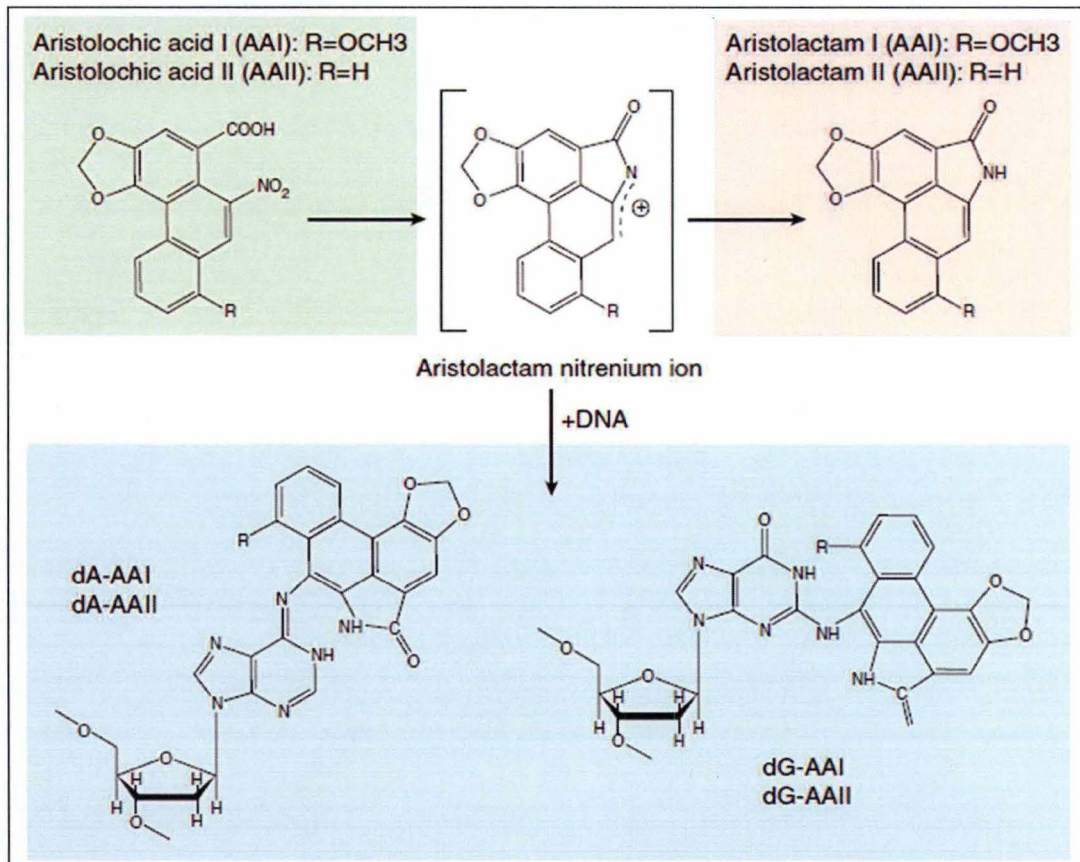


Figure 6 : Métabolisation des acides aristolochiques et formation d'adduits d'ADN. (Debelle et al., 2008)

La susceptibilité aux AA varie d'une personne à l'autre. En effet, elle dépend du taux d'expression des enzymes de métabolisation de ces acides et des enzymes de détoxification hépatiques, une détoxification insuffisante étant à l'origine d'une plus grande accumulation des AA au niveau des tubules rénaux (Stiborova et al., 2008b). L'expression de ces enzymes dépend du profil génétique des individus et est également influencée par le sexe, la consommation de médicaments ou de drogues ainsi que par l'environnement chimique. L'expression et l'activité des OAT qui sont impliqués dans le transport de ces acides interviennent aussi (Dickman et al., 2011). De plus, la gravité de la NAA est bien évidemment influencée par la dose et le temps d'exposition aux AA. Enfin, il a été constaté que seuls les AAI sont responsables des effets néphrotoxiques conduisant à des perturbations tubulaires et à une fibrose interstitielle. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore parfaitement élucidés. Cependant, en ce qui concerne les attaques génotoxiques, AAI et AAII provoquent les mêmes dommages car les deux formes se lient à l'ADN de façon similaire (Shibutani et al., 2007).

2.3. Effets cytotoxiques

2.3.1. Cancérogenèse

Les adduits d'ADN formés par les métabolites des AA sont responsables d'un développement de tumeurs. En effet, ils perturbent la transcription et la réplication de l'ADN, induisant ainsi un dérèglement du cycle cellulaire. L'adduit qui est retrouvé le plus souvent dans les tumeurs est le dA-AAI. Celui-ci est particulièrement persistant et est à l'origine des mutations de type transversions AT → TA. Ces mutations sont fréquemment observées au niveau du codon 61 de l'oncogène H-ras chez les rongeurs. Dans les zones d'atypies et les tumeurs de l'urothélium, une surexpression du gène *p53* a également été détectée. Celle-ci est causée par une mutation de transversion de type AAG → TAG dans le codon 139 de l'exon 5 (Lys → Stop). Cette mutation a été retrouvée *in vitro* et *in vivo* chez des rongeurs intoxiqués aux AA mais également chez des patients atteints de NAA ou de NEB (Stiborova et al., 2008a). L'expression de nombreux autres gènes est altérée suite à une intoxication aux AA, à savoir des gènes impliqués dans la fibrogenèse, la réponse au stress, le cycle cellulaire, l'apoptose et la biotransformation (Chen et al., 2010).

Différents tissus peuvent accumuler des adduits d'AA. Ceux-ci ont été retrouvés au niveau du rein, de la vessie, de l'estomac, de l'intestin, du foie, de la rate et des poumons de souris ayant reçu des injections intra-péritonéales d'AAI et d'AAII. Le rein reste toutefois l'organe le plus atteint, les adduits étant majoritairement localisés à proximité des OAT (Baudoux et al., 2012). Le deuxième organe le plus touché est la vessie. La longue demi-vie des AA est responsable de la prévalence importante des tumeurs (Shibutani et al., 2007).

2.3.2. Néphrotoxicité

Les dégâts causés par les AA ont des répercussions sur les reins autant au niveau structurel que fonctionnel. Le segment S3 des tubules proximaux est le plus touché étant donné la présence de nombreux OAT et son activité métabolique importante (Brezis and Rosen, 1995). Ces acides provoquent le développement d'une nécrose des CETP initialement localisée au niveau du cortex superficiel puis progressant vers le cortex profond, laissant les glomérules relativement épargnés. L'étude de l'expression de la NEP renforce cette observation. En effet, cette ectoenzyme présente au niveau de la bordure en brosse des tubules proximaux est faiblement détectée dans les reins après une exposition aux AA. Le dosage des urines révèle, quant à lui, une importante enzymurie de NEP (Nortier et al., 1997), preuve de la présence de lésions tubulaires. La NAG (N-acétyl-β-D-glucosaminidase), une enzyme lysosomale localisée dans les tubules proximaux est, elle aussi, abondamment excrétée après une intoxication aux AA. Cette nécrose cellulaire induit une infiltration de cellules inflammatoires, à savoir des macrophages et des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺. La phase aiguë de la NAA est caractérisée par ces nécroses tubulaires et la présence de quelques cellules inflammatoires au niveau de l'interstitium, à proximité des zones lésées (Pozdzik et al., 2008).

La phase chronique de cette néphropathie s'installe progressivement avec l'accumulation de cellules immunocompétentes qui induisent le développement d'une fibrose péri-tubulaire. Les cellules perdent peu à peu leur capacité de régénération et certaines entrent même en apoptose suite à l'activation des caspases 3 et 7, comme le montrent des études

effectuées *in vivo* sur des rats (Liu et al., 2003) et *in vitro* sur des cellules tubulaires LLC-PK1 (Hsin et al., 2006). Les tubules sont, par conséquent, atrophiés (Debelle et al., 2002). Cette diminution de la capacité de réparation tissulaire est mise en évidence par une perte progressive de l'expression tubulaire de PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Liu et al., 2003). Une intoxication aux AA est également associée au développement d'un stress oxydatif. Celui-ci peut être causé par des perturbations de l'expression d'enzymes anti-oxydantes ou des dommages au niveau des mitochondries dont le contenu est alors libéré (Nangaku, 2006) (Chen et al., 2010). De plus, l'expression des marqueurs des cellules mésenchymateuses augmente tandis que celle des marqueurs des cellules endothéliales devient de moins en moins importante. Cela suggère une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tubulaires. Bien que la signification d'un point de vue pathologique de ce processus relève du débat, il pourrait expliquer l'épaississement et la rupture de la membrane basale des tubules que l'on observe dans les cas de NAA. Des analyses effectuées sur des rats montrent qu'au cours de cette étape, les cellules épithéliales perdent leur polarité et leur capacité d'adhésion, leur cytosquelette est réorganisé et elles deviennent motiles (Pozdzik et al., 2008). Des tumeurs de l'urothélium sont également induites par les AA. Toutes ces perturbations de la structure rénale se reflètent au niveau fonctionnel avec notamment une augmentation de la créatinine plasmatique, une protéinurie massive et une polyurie (Lebeau et al., 2005).

La NAA comprend également des perturbations au niveau vasculaire, celles-ci étant toutefois peu documentées. Une raréfaction des capillaires péri-tubulaires a été observée, ainsi que l'installation d'une fibrose interstitielle qui augmente la distance entre les capillaires et les cellules tubulaires (Choi et al., 2000). Le flux sanguin péri-tubulaire est également perturbé, suite à une modification de la balance des facteurs vasoactifs (Futrakul et al., 2003) (Nangaku, 2006) (Wen et al., 2008). Ces altérations privent les tissus rénaux d'oxygène et de nutriments, induisant ainsi le développement d'une ischémie (Sun et al., 2012). Il s'en suit alors une augmentation de l'expression de HIF-1 α qui est une protéine participant à la réponse néphroprotective à l'hypoxie. De plus, l'endothéline-1 (ET-1) est surexprimée tandis que la biodisponibilité en NO est diminuée avec pour conséquence des perturbations de l'équilibre hémodynamique (Debelle et al., 2002) (Lebeau et al., 2005) (Wen et al., 2008). Une diminution de l'expression de l'aminopeptidase P (JG12) dans des reins de rats en contact avec des AA est également observée, JG12 renseignant sur l'intégrité des cellules endothéliales. Enfin, il a été observé que l'expression du VEGF est faible au niveau des capillaires péri-tubulaires lésés. Cette cytokine possède de nombreuses fonctions, notamment le maintien de la perméabilité vasculaire, la survie des cellules endothéliales et l'angiogenèse. Elle induit également la production de NO par les cellules endothéliales (Sun et al., 2012).

2.4. Modèles expérimentaux de la NAA

Les premières études toxicologiques effectuées sur les AA remontent à 1962, lorsque Peters et ses collaborateurs ont administré des extraits d'*Aristolochia clematitis* à des rats pendant 12 jours. Ils ont alors constaté un gonflement des cellules tubulaires distales et proximales avec des nécroses occasionnelles conduisant à une IRA, une diminution de la clairance de la créatinine, de l'inuline et de l'urée (Peters and Hedwall, 1963). Quelques années plus tard, l'équipe de Mengs a observé des lésions néoplasiques du tube digestif après une administration par voie orale d'un mélange d'AAI et AAI à des rats Wistar et des souris NMRI (Mengs, 1983). Depuis lors, de nombreuses études ont été effectuées *in vitro* ainsi qu'*in vivo* sur des souris, des rats et des lapins ayant reçu de l'AAI et/ou de l'AAII à des doses différentes. Les modes d'administration testés sont variés et incluent la voie orale, les injections sous-cutanées ou encore intrapéritonéales (Nortier et al., 1997) (Debelle et al., 2002) (Sato et al.,

2004) (Lebeau et al., 2005) (Shibutani et al., 2007) (Wen et al., 2008) (Huang et al., 2013b). Des protocoles à court terme ont permis la caractérisation de la phase aiguë de la NAA, tandis que ceux menés à long terme ont servi à l'étude de la phase chronique. De façon générale, l'étude histologique des reins de ces animaux ainsi que celle des biopsies humaines ont révélé d'importantes lésions tubulaires associées au développement d'un infiltrat inflammatoire et une fibrose tubulo-interstitielle progressive. D'un point de vue fonctionnel, cette néphropathie est accompagnée d'une augmentation de la créatinine plasmatique, d'une glycosurie et d'une protéinurie. Des carcinomes de l'urothélium sont également observés au cours du développement de la NAA. Bien que ces tumeurs apparaissent généralement en phase tardive de la maladie, il existe quelques cas où un cancer se développe après une intoxication aux AA sans qu'il n'y ait de signes d'insuffisance rénale (Nortier et al., 2003).

3. Monoxyde d'azote (NO)

3.1. Généralités

Le NO est une molécule de signalisation dont la fonction principale est la régulation de l'homéostasie et du tonus vasculaire (Fleming and Busse, 1999). Ce messager cellulaire agit également au niveau de la neurotransmission et régule la transcription et la traduction de gènes, notamment en activant des protéines kinases dans des cellules neuronales et gliales (Gudi et al., 1999). Il induit également des modifications protéiques post-traductionnelles telles que la ribosylation à l'ADP (Forstermann and Sessa, 2012). Des perturbations de la production et la biodisponibilité du NO sont à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires et rénales, dont la NAA (Baylis, 2006) (Baylis, 2008) (Wen et al., 2008).

3.2. Synthèse du NO

La synthèse du NO est assurée par trois isoformes de *nitric oxide synthases* (NOS), à savoir la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS). Ces trois synthases sont des homodimères qui utilisent la L-arginine (L-Arg) comme substrat ainsi que l'oxygène moléculaire et le nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate (NADPH) réduit comme co-substrats. Les cofacteurs des différentes isoenzymes correspondent à la flavine adénine mononucleotide (FAD), la flavine mononucleotide (FMN) et au (6R-)5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterine (BH₄) (Figure 7). Le mode d'action des NOS implique un transfert d'électrons venant du NADPH via la FAD et la FMN. Dans un premier temps, la L-Arg est hydroxylée en N-hydroxy-L-Arginine qui est elle-même oxydée en L-citrulline et en NO (Fleming and Busse, 1999) (Forstermann and Sessa, 2012).

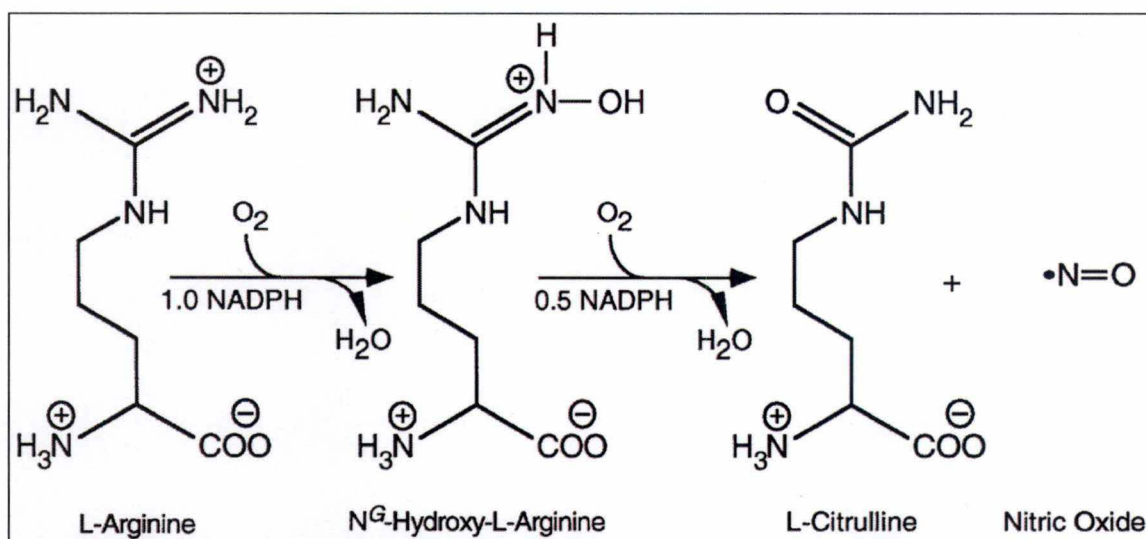


Figure 7 : Synthèse de NO et de L-citrulline par les NOS à partir d' O_2 et de L-arginine.
(Andrew and Mayer, 1999)

Chacune des trois isoformes est codée par un gène différent et possède son propre profil d'expression. En ce qui concerne la nNOS, elle est exprimée de façon constitutive au niveau des neurones des systèmes nerveux central et périphérique. Elle est également retrouvée notamment dans les îlots pancréatiques, les cellules musculaires lisses des vaisseaux et la *macula densa* rénale (Forstermann et al., 1994). Son activité est modulée par le Ca^{2+} et la calmoduline (Zhou and Zhu, 2009).

La eNOS est, quant à elle, également exprimée de manière constitutive mais, cette fois, principalement au niveau des cellules endothéliales (Bredt, 1999). Elle est aussi détectée dans une moindre mesure dans les plaquettes, les myocytes cardiaques ou encore certains neurones. De même que la nNOS, son activité est modulée par le Ca^{2+} qui favorise sa liaison avec la calmoduline. Les Hsp90, qui sont des chaperonnes, participent également à la régulation de son activité, ainsi que des protéines cavéolaires (Garcia-Cardena et al., 1998). Enfin, il a été constaté que cette activité peut être influencée par des stimuli tels que le *shear stress* qui induit la phosphorylation de la eNOS. Cette phosphorylation, qui dépend notamment du VEGF et des œstrogènes, s'effectue via les voies de transduction du signal qui incluent l'Akt sérine/thréonine kinase et l'adénosine monophosphate protéine kinase (AMPK) (Fleming and Busse, 2003).

Enfin, la iNOS est une isoenzyme dont l'expression est induite par le stress oxydatif, des lipopolysaccharides bactériens, des cytokines et autres acteurs de l'inflammation (Nathan and Hibbs, 1991). Une fois qu'elle est induite, elle est exprimée dans plusieurs types cellulaires et reste active, indépendamment de la concentration en Ca^{2+} disponible (Forstermann and Sessa, 2012).

3.3. Rôles du NO

Le NO possède différentes fonctions qui vont notamment dépendre de l'enzyme responsable de sa production. Lorsqu'il est libéré par la nNOS, le NO est impliqué dans la neurogenèse, l'apprentissage et la mémorisation (Zhou and Zhu, 2009). Il joue un rôle de neurotransmetteur et participe à la régulation de la pression sanguine ainsi qu'à la relaxation des tissus musculaires lisses. Une inhibition de l'activité de la nNOS peut induire une

hypertension. De plus, de nombreuses maladies neurodégénératives ont été liées à des perturbations des voies de signalisation dépendant du NO (Steinert et al., 2010). C'est le cas de la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de nombreuses scléroses. Enfin, des perturbations du tonus gastro-intestinal peuvent être causées par une surproduction de NO (Tottrup et al., 1991).

La eNOS libère du NO qui agit en tant qu'agent vasodilatateur afin d'éviter une pression sanguine élevée (Shesely et al., 1996). Lorsque la eNOS est incapable de produire du NO, la nNOS peut intervenir afin de maintenir une certaine dilatation des vaisseaux. De plus, le NO libéré par la eNOS inhibe l'agrégation et l'adhésion plaquettaires (Alheid et al., 1987). Ainsi, il s'oppose au développement de thromboses et réduit la prolifération des cellules musculaires lisses, qui est dépendante de la libération des facteurs de croissance venant des plaquettes. Le NO intervient également au niveau de l'inflammation en induisant la diminution de l'expression des chémoattractants comme les MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) et en inhibant l'adhésion des leucocytes aux vaisseaux (Zeiher et al., 1995). Il contribue aussi au remodelage du compartiment vasculaire en stimulant l'angiogenèse et en activant les progéniteurs des cellules endothéliales. Une dysfonction endothéliale induite par une insuffisance de la biodisponibilité en NO est observée chez des patients présentant les facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires (Baylis, 2008). Ces facteurs correspondent à l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète ou encore la consommation de tabac. Il est également à noter qu'un découplage de la eNOS a pu être observé dans de nombreuses maladies vasculaires. Ce découplage a lieu lorsque la eNOS synthétise des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) et non plus du NO (Thum et al., 2007).

Le dernier cas correspond au NO synthétisé par la iNOS. Le NO a, cette fois, un effet cytotoxique. En effet, il peut se lier à des enzymes qui contiennent du fer dans leur site catalytique et les inhiber. C'est le cas d'enzymes impliquées dans le transport d'électrons au niveau des mitochondries ainsi que les ribonucléotides réductases qui interviennent dans la réplication de l'ADN et les *cis*-aconitases du cycle de Krebs. De telles actions sont utiles afin d'éliminer les micro-organismes pathogènes et les tumeurs (Nathan and Hibbs, 1991) (Wink et al., 1991). Cependant, lorsqu'il est produit en quantité importante ou libéré dans des sites inappropriés, le NO peut endommager des cellules saines. Il a également été associé à la progression du choc septique en induisant une chute de la pression sanguine (Forstermann and Sessa, 2012).

3.4. Le NO intrarénal

Le rein est un organe qui est caractérisé par une vascularisation importante, étant donné qu'il reçoit 25% du débit cardiaque. Par conséquent, l'expression tissulaire des NOS présente une distribution particulière permettant une régulation optimale de la synthèse du NO. En ce qui concerne la nNOS, elle est abondamment exprimée dans la *macula densa* ainsi que dans les tubules proximaux et distaux, les canaux collecteurs et certains neurones. Elle est également localisée dans les artères rénales du hile et les artères inter-lobulaires. La eNOS est majoritairement exprimée dans l'endothélium et dans une moindre mesure au niveau des tubules. Enfin, la iNOS est retrouvée dans différents types cellulaires après un stimulus pro-inflammatoire comme une ischémie/reperfusion.

Le NO exerce dans le rein plusieurs fonctions qui ont pour effet de promouvoir la natriurèse et la diurèse. Premièrement, ce messager cellulaire intervient dans la régulation de l'hémodynamisme rénal en contrôlant le tonus vasculaire. Il permet ainsi au rein d'avoir une résistance vasculaire plus faible que les autres organes. De plus, une augmentation de la

pression sanguine rénale induit une stimulation de la synthèse du NO, celle-ci s'accompagnant d'une natriurèse et permettant le retour à une pression plus stable. Pour ce faire, le NO peut directement agir au niveau des tubules et inhiber la réabsorption du sodium, provoquant ainsi une augmentation de la diurèse et de la natriurèse. Il intervient également dans le feedback tubuloglomérulaire. Comme expliqué précédemment, ce rétrocontrôle permet de maintenir le débit de la filtration glomérulaire dans des valeurs constantes, notamment après une augmentation de la pression sanguine. Cette dernière est perçue au niveau de la *macula densa* via une augmentation de NaCl et induit la constriction des artérioles afférentes, diminuant ainsi la filtration. La nNOS synthétisée abondamment dans la *macula* s'oppose à ce phénomène et permet de rétablir la natriurèse. Dans la médulla, la synthèse du NO est stimulée par des vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II, la vasopressine et la noradrénaline. Ce vasodilatateur peut donc ainsi s'opposer à leur effet lorsque leur concentration augmente et ainsi maintenir un certain flux sanguin dans la médulla. Ceci protège contre le développement de l'hypertension. Le NO module aussi l'activité des nerfs sympathiques rénaux (Mount and Power, 2006).

Des perturbations dans la production du NO ont pu être observées dans de nombreuses maladies rénales. Elles reflètent dans la majorité des cas un dysfonctionnement endothélial. L'un des éléments à l'origine d'une insuffisance en NO est la déficience en L-Arg qui est le substrat des NOS, qui peut survenir notamment lorsque la synthèse de L-Arg est diminuée ou lorsque cette molécule est utilisée dans d'autres voies de signalisation. D'autres facteurs interviennent dans la diminution de la production de NO, à savoir une augmentation d'inhibiteurs endogènes des NOS comme l'asymétrique diméthylarginine (ADMA) ou encore une diminution de l'activité des NOS. Enfin, le stress oxydatif induit une diminution de la biodisponibilité du NO. Il est observé au début de nombreuses maladies rénales et augmente en même temps que ces maladies progressent (Baylis, 2006) (Baylis, 2008) (Wen et al., 2008).

Tous ces facteurs responsables d'une insuffisance en NO sont à l'origine de lésions tubulo-interstitielles, d'une ischémie tissulaire, d'une hypertension glomérulaire, de glomérulosclérose et d'une protéinurie. De nombreuses recherches ont montré qu'une diminution en NO liée à une dysfonction endothéliale est impliquée dans la progression de la plupart des maladies rénales (Baylis, 2008) (Wen et al., 2008).

3.5. *Modulateurs pharmacologiques*

De nombreux modulateurs de la production de NO ont été utilisés dans le but d'étudier les différentes fonctions exercées par ce messager cellulaire. C'est le cas du N-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) et du N^G-monométhyl-L-arginine (NMA) qui sont des analogues de la L-Arg et se fixent aux NOS afin d'inhiber de façon spécifique et sélective leur activité. Un autre inhibiteur nommé N⁶-(1-iminoethyl)-L-lysine (L-NIL) cible quant à lui uniquement la iNOS et empêche sa dimérisation (Sun et al., 2012) (Lee et al., 2012). A l'inverse, une administration de L-Arg induit l'augmentation de la synthèse de NO par chacune des trois NOS (Sun et al., 2012).

4. Objectifs du travail

Durant ce mémoire, nous nous sommes intéressés à un cas particulier de néphropathie induite par des toxines, à savoir la NAA. De plus en plus de cas sont répertoriés dans le monde, toutefois, les mécanismes impliqués dans la progression de cette maladie sont encore mal compris. De nombreuses recherches ont été effectuées sur la NAA et certaines ont permis de constater que cette maladie est associée à une diminution de la biodisponibilité en NO intra-rénal, induisant ainsi un déséquilibre de la balance des agents vasoactifs.

Dès lors, nous avons tenté de déterminer l'impact de cette réduction de la biodisponibilité en NO dans cette néphropathie et nos recherches se sont attardées sur le compartiment vasculaire, étant donné les rôles clés que peut exercer le NO sur l'endothélium. En effet, notre hypothèse est que les AA, en perturbant l'équilibre entre les agents vasoactifs, pourraient induire une ischémie rénale toxique qui contribuerait aux processus pathologiques survenant en cas de NAA.

Pour atteindre notre but, nous avons mis au point un modèle murin de NAA aiguë et avons analysé les effets d'une administration de L-Arg qui, pour rappel, est un substrat des NOS. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets d'un tel traitement sur la biodisponibilité du NO intra-rénal. Par la suite, nous avons analysé l'impact d'une administration de L-Arg en cas de NAA sur la structure et la fonction rénale, et enfin sur une éventuelle ischémie tissulaire.

Matériel et méthodes

1. Protocole expérimental

1.1. Animaux

Dans le cadre de cette étude, 45 mâles C57Bl/6 (Janvier, France) âgées de 5 semaines et pesant approximativement 20 g ont été intégrées dans quatre groupes expérimentaux. Les procédures effectuées sur ces animaux ont été approuvées par le comité éthique local du bien-être et de la santé des animaux. Les souris sont hébergées dans un local approprié avec : la température maintenue constante à 21°C, l’humidité contrôlée, l’éclairage suivant un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux ont libre accès à de l’eau quotidiennement renouvelée et à de la nourriture standard adaptée aux rongeurs (SAFE A03, France).

1.2. Traitements

La procédure expérimentale s’est étendue sur une durée de 13 jours, à savoir du jour J-8 au jour J4. Les analyses ont été effectuées sur des animaux répartis de manière aléatoire dans quatre groupes différents en fonction du traitement (voir Tableau 1).

Tableau 1 : Détail des différents groupes expérimentaux et du traitement correspondant

	Contrôle	AAI	Contrôle + L-Arg	AAI + L-Arg
Nombre de souris	8	14	8	15
Solution injectée par voie i.p.	PBS + NaCl 0,9% (dilution 1:2)	Acide aristolochique I + NaCl 0,9% (dilution 1:2)	PBS + NaCl 0,9% (dilution 1:2)	Acide aristolochique I + NaCl 0,9% (dilution 1:2)
Dose injectée par voie i.p.	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg
Traitement par voie orale	Eau de ville	Eau de ville	L-Arg 5% dans l’eau de ville (Sigma-Aldrich, Etats-Unis)	L-Arg 5% dans l’eau de ville (Sigma-Aldrich, Etats-Unis)

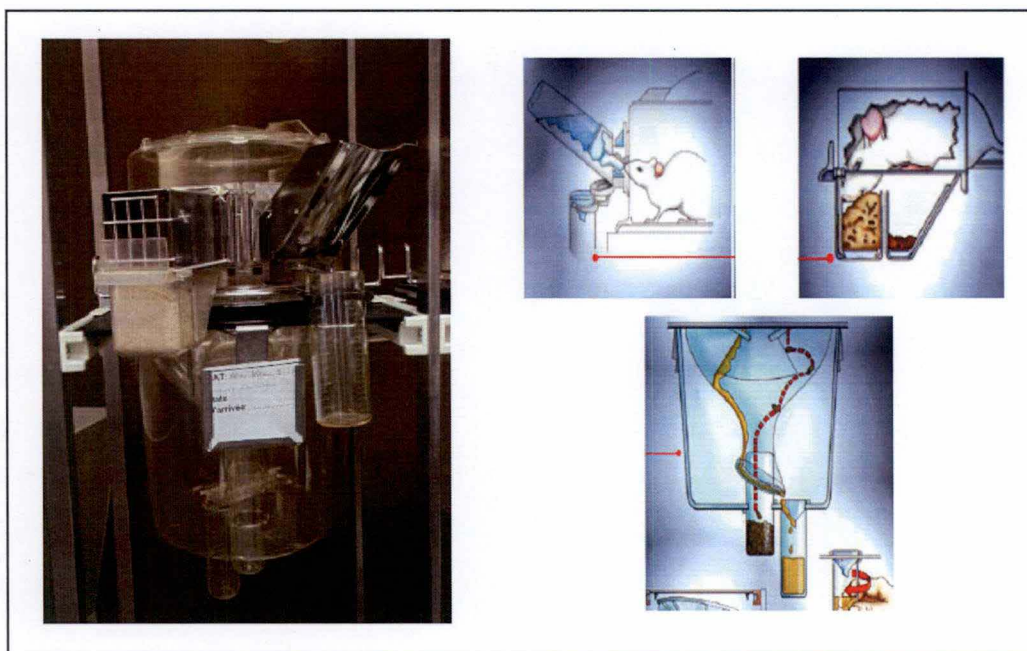
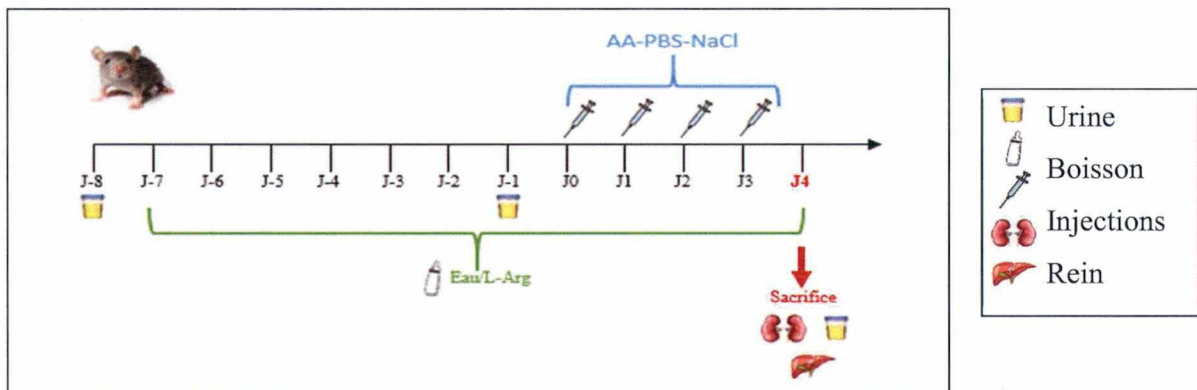
i.p. : voie intrapéritonéale ; L-Arg : L-Arginine.

En ce qui concerne la préparation de la solution injectable contenant les acides aristolochiques (AA), une solution mère a été préparée en diluant 1 mg d’AAI (Applichem, Allemagne) dans 1 ml de PBS (Phosphate buffer saline ; pH 7,4). Afin de solubiliser les AA, cette solution a été placée dans un bain-marie à 60°C et chauffée pendant 40 minutes. Elle a ensuite été vortexée et conservée à l’abri de la lumière tout au long de la période expérimentale. Les injections i.p. ont été effectuées avec la solution mère diluée 1:2 dans du NaCl stérile 0,9 %, à raison de 10 ml/kg de poids corporel.

2. Echantillons biologiques

Aux jours J-8, J-1 et J4, des échantillons d’urine ont été récoltés dans le but d’analyser différents paramètres rénaux et métaboliques (Figure 8). Ces récoltes ont été effectuées sur une période de 24h, au cours de laquelle les souris sont hébergées dans des cages métaboliques

permettant de séparer les excréments et l'urine (Figure 9). Afin d'éviter l'évaporation de l'urine au cours de cette période, le récipient de récolte contient une fine couche d'huile. Une centrifugation a ensuite été effectuée à 2500 g par minutes pendant 10 minutes afin d'éliminer l'huile et les impuretés. L'urine récoltée a été aliquotée et conservée à -80°C pour des analyses ultérieures. Ce type d'hébergement a également permis de mesurer les quantités de nourriture et d'eau ingérées. De plus, le poids corporel des souris a été mesuré régulièrement, tout au long du protocole expérimental.



Au terme du protocole (J4), les souris ont été euthanasiées. Une heure avant le sacrifice, du pimonidazole (HypoxyporeTM-1, Burlington, Etats-Unis) a été injectée en i.p. dans le but d'évaluer une éventuelle atteinte hypoxique du tissu rénal. Par la suite, les souris (n=22) ont été anesthésiées à l'aide de médétomidine (0,5 mg/kg, JANSSEN, Belgique) et de kétamine (80 mg/kg, CEVA, Belgique) par voie i.p. Une laparotomie a ensuite été effectuée afin de prélever le rein droit ainsi que le foie. Chaque organe a été congelé dans de l'azote

liquide (-198°C) et conservé à -80°C pour effectuer des analyses ultérieures (q-PCR, Western Blot, ELISA). Ces manipulations ont été réalisées dans des conditions « *RNase free* ». Enfin, suite à la section de la veine cave rénale, une perfusion intracardiaque dans le ventricule gauche a été mise en place, dans un premier temps avec une solution saline stérile (12 ml) afin d'éliminer le sang du réseau vasculaire, ensuite avec du paraformaldéhyde (PAF, 12 ml) pour fixer les tissus (Pompe à perfusion : Harvard Apparatus, Etats-Unis ; Débit : 1 ml/min). Le rein droit fixé a été prélevé et conservé dans du PAF en vue d'analyses histologiques et immunohistochimiques.

Un deuxième protocole a été effectué avec d'autres souris (n=13) dans le but de récupérer des échantillons de sang. La fixation des organes à l'aide d'une perfusion avec du PAF devrait donc être évitée. Dans ce cas, les souris ont été anesthésiées de façon similaire aux souris du protocole précédant, à savoir avec des injections de médétomidine (0,5 mg/kg, JANSSEN, Belgique) et de kétamine (80 mg/kg, CEVA, Belgique) par voie i.p. Une laparotomie a ensuite été effectuée, suivie d'un prélèvement de sang par ponction intracardiaque. Celui-ci a été mis en contact avec de l'héparine (LEO, Belgique) afin d'éviter qu'il ne coagule. Le plasma a été récupéré après une centrifugation du sang à 2500 g pendant 15 minutes. Par la suite, les deux reins ainsi que le foie ont été prélevés. Un rein et une partie du foie ont été congelés dans de l'azote liquide (-198°C) et conservé à -80°C pour effectuer des analyses ultérieures (q-PCR, Western Blot, ELISA). Ces manipulations ont été réalisées dans des conditions « *RNase free* ». Le deuxième rein de même que la partie restante du foie ont été conservés dans du PAF en vue d'analyses histologiques et immunohistochimiques.

3. Approches analytiques

3.1. Mesure des concentrations urinaires et plasmatiques en Na^+ et K^+

Les concentrations urinaires et plasmatiques en Na^+ et K^+ ont été déterminées à l'aide d'un photomètre à flamme (Instrumentation Laboratory 943, Italie) qui chauffe les échantillons et excite les électrons. Lorsque les électrons retournent à un état stable, de l'énergie est émise sous forme d'un photon. L'intensité d'émission est directement proportionnelle au nombre d'ions présents dans les échantillons. Cette intensité est alors convertie en concentration qui est exprimée en mEq/L.

3.2. Mesure de l'osmolarité urinaire

Afin de déterminer l'osmolarité des urines (mOsm/L), les échantillons ont préalablement été dilués (1:5) pour ensuite être analysés à l'aide d'un osmomètre (Fiske® 210 Micro-Sample Osmometer, Etats-Unis). Cet appareillage analyse le point de congélation d'une solution qui varie en fonction du nombre de particules présentes dans la solution en question. L'échantillon est donc refroidi et sa cristallisation est induite par une impulsion mécanique. Il est ensuite réchauffé et un équilibre est atteint entre l'eau et la glace. Plus l'échantillon a une osmolarité importante, plus la température nécessaire pour atteindre le point de congélation diminue.

3.3. *Mesure des concentrations en glucose urinaire*

Les concentrations en glucose urinaire (mg/dl) ont été mesurées grâce au système de détection OneTouch® Vita™ (Lifescan Benelux, Belgique). Pour cela, un capillaire est introduit dans un lecteur, puis une goutte d'urine est placée sur ce capillaire. Le lecteur indique alors à l'écran la concentration en glucose des urines qui sera multipliée par la diurèse et exprimée en mg/24h.

3.4. *Quantification de la protéinurie*

La quantification de la protéinurie a été effectuée selon la méthode de Bradford (Bradford Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Etats-Unis). Ce dosage donne des indications quant à la fonction rénale. De la γ -globuline (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) a été utilisée comme protéine standard et du bleu de coomassie comme réactif (Coomassie Brilliant Blue 20% - Met OH:H₂O 72% - Acide acétique glacial 8%). Les échantillons d'urine ont été dilués (1:50 pour AA1 et AA3 ; 1:400 pour AA2 et AA4) et répartis sur une plaque multi-puits. Du bleu de coomassie a ensuite été ajouté aux urines et aux standards induisant ainsi la liaison entre le colorant et les protéines. Cette liaison est responsable d'un changement de couleur des échantillons dont l'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre (Versa max micro plate reader, Molecular devices, Etats-Unis) à 620 nm après une incubation à température ambiante pendant 30 minutes. Une courbe standard a ensuite été réalisée grâce aux échantillons de concentration connue et à leur absorbances relative. L'équation obtenue a permis de calculer la concentration des échantillons urinaires (μ g/ml).

3.5. *Détermination des concentrations en créatinine plasmatique et urinaire*

Le dosage de la créatinine est utilisé afin d'évaluer le débit de filtration glomérulaire. En effet, une importante concentration de créatinine dans le sang, associée à une faible quantité excrétée, révèle une insuffisance de la filtration glomérulaire. Par ailleurs, la concentration urinaire en créatinine permet de normaliser les valeurs des concentrations d'autres protéines excrétées. La mesure de la concentration en créatinine plasmatique a été effectuée par HPLC (Binary HPLC pomp – Waters, Etats-Unis) en collaboration avec l'Unité de Néphrologie expérimentale de l'hôpital ERASME de l'ULB (Prof. Nortier, ULB – Bruxelles). Cette technique est caractérisée par le passage du plasma dans une colonne de chromatographie qui sépare les solutés en fonction de leur hydrophobicité et de leur charge. Ceux-ci traversent ensuite un détecteur à UV permettant de doser les molécules d'intérêt. Pour ce qui est de la créatinine urinaire, le dosage a été effectué à l'aide de l'Assay Design® Creatinine Detection Kit (Stressgen, Etats-Unis) basé sur le principe de la réaction de Jaffé. Premièrement, les urines diluées (1:20) et les standards ont été déposés dans des puits. Une incubation avec le réactif contenant de l'acide picrique a ensuite été réalisée à température ambiante pendant 30 minutes. Enfin, l'absorbance a été lue à 490 nm et convertie en concentrations (mg/dl) sur base de l'établissement de la courbe standard.

3.6. *Dosage colorimétrique des nitrates/nitrites urinaires*

Le NO est un composé caractérisé par un temps de demi-vie court. En effet, il est rapidement converti en nitrate et en nitrite (NOx). Ces produits stables sont donc utilisés afin de déterminer la concentration urinaire du NO. Le dosage a été effectué sur des urines diluées à 1:150 et placées pendant 1 heure à température ambiante dans des puits avec des nitrates réductases induisant la conversion du nitrate en nitrite (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit,

Cayman Chemical Company, Etats-Unis). Le nitrite a été à son tour converti en un composé bleu-violet sous l'action des réactifs de Griess pendant une dizaine de minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Versa max micro plate reader, Molecular devices, Etats-Unis) à 540 nm. Les concentrations ($\mu\text{Mole/l}$) ont été calculées à l'aide d'une courbe standard avec des échantillons de concentration connue.

3.7. Dosage de la concentration urinaire en NAG

Le dosage de la NAG (*N*-Acetyl- β -D-glucosaminidase) urinaire permet de caractériser des éventuelles lésions des tubules proximaux. En effet, cette protéine de haut poids moléculaire (entre 130 et 140 kDa) n'est pas filtrée par les glomérules. Sa présence en grande quantité dans les urines n'est détectée qu'en cas que de lésion des cellules tubulaires. La mesure de la concentration urinaire de la NAG a été réalisée par un dosage colorimétrique (Roche, Diagnostics, Allemagne). En premier lieu, la solution substrat (composée de sodium 3-cresolsulfonphthaleinyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide et de borax) a été incubée pendant 5 minutes à 37°C dans des puits. Par la suite, les échantillons d'urine ou les solutions standards ont été déposés dans les puits et ont subi une incubation à 37°C durant 15 minutes. Enfin, la solution stop a été ajoutée et après une incubation de 10 minutes à 37°C, l'absorbance a été lue à 540 nm. Les concentrations (mU/ml) ont été calculées à l'aide d'une courbe standard avec des échantillons de concentration connue.

3.8. Western Blot

- Préparation des échantillons

Le Western Blot a été effectué sur des échantillons de tissus rénaux. La première étape a été l'homogénéisation de tissus pesant entre 40 et 60 mg et baignant dans 500 μl de tampon de lyse RIPA (Cell Signaling Technology, Etats-Unis) à l'aide d'un potter électrique (Bioblock Scientific, France). Afin de protéger les protéines contre une dégradation induite par des protéases, 5 μl d'inhibiteur de protéase (Sigma, Etats-Unis) ont été ajoutés. Un potter et un homogénéisateur (Tenbroeck, Kimble/Kontes Glass Co, Vineland, NJ) ont permis de rompre les membranes cellulaires et d'homogénéiser les tissus. La concentration en protéines a été évaluée à l'aide du kit Pierce BCA (Bicinchoninic Acid Assay) Protein Assay (Thermo Scientific, Etats-Unis). Cette technique est basée sur la capacité des protéines à induire la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ dans un milieu alcalin, permettant ainsi à l'acide bicinchoninique de se lier au Cu^+ . Ce complexe soluble est ensuite détecté à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 562 nm après 30 minutes d'incubation à 37°C. La solution standard utilisée a été de l'albumine de sérum bovin. L'absorbance obtenue était directement proportionnelle à la concentration en protéines tissulaires. Les concentrations ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ont été calculées à l'aide d'une courbe standard avec des échantillons de concentration connue.

- Préparation des gels

Le protocole pour Western Blot commence par le montage d'un gel à 9 puits entre deux plaques de verre. Ce gel est composé de deux parties, une première (*running gel*) permettant la migration des protéines et une deuxième (*stacking gel*) située au-dessus du *running gel* favorisant l'entassement des protéines. Toutes deux sont composées d'eau distillée, d'acrylamide 30% (Bio-Rad, Chine), de Tris-HCl (Bio-Rad, Chine), de SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate, Bio-Rad, Chine), d'APS 10% (Ammonium persulfate, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) et de TEMED (Tétraméthylethylènediamine, Bio-Rad, Chine) présents en différentes

concentrations en fonction du type de gel et de sa concentration. Le *running gel* est placé en premier entre les plaques de verre. Une fois qu'il s'est correctement solidifié, le *stacking gel* est à son tour coulé entre les plaques et un peigne est ajouté en surface pour former les puits.

- Migration des échantillons

Après avoir dosé la quantité de protéines présentes dans les échantillons, un volume a été prélevé de façon à charger 35 µg de protéines. À ce volume ont été ajoutés de l'eau distillée afin d'arriver à 16 µl de solution, ainsi que 4 µl d'une solution alourdissante et de β-mercaptoéthanol. La solution alourdissante contient du bleu permettant la visualisation de la migration des protéines tandis que le β-mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures des protéines et facilite ainsi leur migration. Les 20 µl totaux ont ensuite été portés à ébullition pendant 2 minutes afin de dénaturer les protéines, puis une brève centrifugation a été effectuée pour pouvoir récupérer un maximum de solution.

Les échantillons ainsi obtenus ont été déposés dans les puits, le premier puits étant réservé à l'étalon protéique (8 µl, Bio-Rad, Etats-Unis) qui permettra d'obtenir des bandes de couleurs différentes et de poids moléculaires connus. Les gels sont ensuite placés dans une cuve contenant un tampon de migration (Tris-Hcl + Glycine + SDS ; pH : 8,5). Un courant électrique de voltage constant (150 ou 180V) est appliqué afin de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et la migration dure environ 50 minutes.

- Transfert

Le transfert implique le passage des protéines des gels vers une membrane PVDF (Polyvinylidene fluoride) qui est activée par une incubation d'une minute dans du méthanol (Prolabo® Chemicals, France). Celui-ci facilite la fixation des protéines venant des gels. Après ce traitement, les membranes ont été rincées à l'eau distillée puis placées dans une solution contenant du tampon de transfert (Tris-HCl + Glycine ; pH : 8,5). Les gels ont ensuite été récupérés après avoir séparé les plaques de verres. Les *stacking gels* ont été retirés et le reste des gels a été immergé dans du tampon de transfert, de même que des éponges et des papiers buvards. Le montage a été effectué comme suit :

- 1 éponge
- 3 papiers buvards
- 1 gel
- 1 membrane
- 3 papiers buvards
- 1 éponge

Le tout a été placé dans une cuve contenant du tampon de transfert et un courant électrique d'ampérage constant (0,3A) a été appliqué pendant 45 minutes. Des glaçons ont été ajoutés afin d'éviter des élévations de température induites par l'ampérage important.

- Incubations avec les anticorps

Avant de les mettre en contact avec les anticorps, les membranes ont été immergées dans du lait dilué dans du PBS + tween afin de saturer les sites antigéniques aspécifiques et ainsi minimiser le bruit de fond. Après 20 minutes d'immersion, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires (Tableau 2) dilués dans du PSB + tween et du lait 5%. Cette incubation a été effectuée overnight en chambre froide sur agitateur. Le lendemain, les membranes ont été immergées dans 3 bains de 20 minutes au PBS + tween suivis d'une

incubation d'1 heure avec un anticorps secondaire correspondant, celui-ci étant dilué dans une solution de PBS + tween avec du lait. Enfin, 3 bains de 20 minutes ont été réalisés dans du PBS + tween.

Tableau 2 : Liste des différents marquages réalisés, des anticorps primaires et secondaires correspondants, du poids moléculaire de la protéine cible et du pourcentage des gels.

Cible	Anticorps primaires	Anticorps secondaires	Poids moléculaire (kDa)	Pourcentage des gels (%)
HIF-1α	Lapin 1:500 (Abcam, Royaume-Unis)	Chèvre anti-lapin HRP, 1/3000 (Dako, Etats-Unis)	107	Running : 10 Staking : 5
HIF-2α	Lapin 1:500 (Abcam, Royaume-Unis)	Chèvre anti-lapin HRP, 1/3000 (Dako, Etats-Unis)	96	Running : 10 Staking : 5
VEGF	Lapin 1:500 (Abcam, Royaume-Unis)	Chèvre anti-lapin HRP, 1/3000 (Dako, Etats-Unis)	42	Running : 12 Staking : 5
eNOS	Lapin 1:500 (Abcam, Royaume-Unis)	Chèvre anti-lapin HRP, 1/3000 (Dako, Etats-Unis)	130	Running : 10 Staking : 5
peNOS	Lapin 1:200 (Abcam, Royaume-Unis)	Chèvre anti-lapin HRP, 1/3000 (Dako, Etats-Unis)	135	Running : 10 Staking : 5
GAPDH	Souris 1 :3000 (Sigma, Etats-Unis)	Chèvre anti-souris HRP, 1/3000 (Dako, Danemark)	37	Running : 10 ou 12 Staking : 5

- Révélation

L'étape de révélation a débuté avec l'incubation des membranes dans du substrat de révélation (Western Lightning® Plus-ECL, Perkin Elmer, Waltham, Etats-Unis). Ce substrat contient deux réactifs dans des proportions 50/50, à savoir le réactif A (Enhanced Luminol Reagent) et le réactif B (Oxidizing Reagent). Après 5 minutes d'incubation dans le substrat, les membranes ont été placées dans une cassette. Par la suite, un film (Amersham Hyperfilm™ ECL, Royaume-Unis) a été ajouté à la cassette dans une chambre noire. Ce film a finalement été inséré dans une machine (Fuji Photo Film CO., LTD, Japon) qui permet de visualiser les bandes formées par les complexes antigène-anticorps.

3.9. Détermination des concentrations rénales en MCP-1

La mesure de la concentration rénale en MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) a été réalisée avec un kit ELISA (BD OptEIA™, Etats-Unis). Les MCP-1 sont des chémokines pro-inflammatoires dont la quantification permet d'évaluer l'inflammation. La première étape du dosage consiste à déposer des anticorps de capture (1:250) dans des micro-puits. Après une incubation overnight à 4°C, les puits ont été bloqués pendant 1 heure avec du diluant qui a ensuite été remplacé par des standards ou des échantillons tissulaires homogénéisés selon la méthode utilisée pour le Western Blot. Ceux-ci ont été placés dans les puits pendant 2 heures à température ambiante. Par la suite, des anticorps de détection (1:250) ont été ajoutés. Après 1 heure d'incubation, la solution substrat composée de tétraméthylbenzidine et de peroxyde d'hydrogène a été posée dans les micro-puits pendant 30

minutes dans le noir. La dernière étape correspond à l'ajout de la solution stop qui a agi durant 30 minutes. L'absorbance a ensuite été lue à 450 nm et convertie en concentration (pg/ml) sur base de la courbe standard.

3.10. PCR quantitative en temps réel

- Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN rénal est un processus à effectuer en condition *RNAse free* afin d'assurer au maximum l'intégrité de l'ARN des tissus. En premier lieu, des échantillons tissulaires de maximum 50 mg sont homogénéisés à l'aide d'un potter électrique (Bioblock Scientific, France) dans 1 ml de Trizol (TRI reagent, Sigma, Etats-Unis). Les homogénats obtenus sont alors maintenus 5 minutes à température ambiante dans des eppendorfs autoclavés. Deux cent µl de chloroforme (VWR, France) sont ensuite ajoutés et les eppendorfs sont secoués vigoureusement pendant 15 secondes. Après une incubation à température ambiante pendant 2 à 3 minutes, les solutions sont centrifugées à 4100 g pendant 20 minutes à 4°C. La phase aqueuse est alors prélevée et déposée dans un eppendorf autoclavé avec 500 µl d'alcool isopropyl (Merck, Allemagne). Par la suite, les échantillons sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante puis centrifugés à 4100 g pendant 15 minutes à 4°C afin d'induire la précipitation de l'ARN. Le surnageant est ensuite retiré et 1 ml d'éthanol 75% (Univar Blandain, Belgique) est ajouté afin de laver le culot. Ensuite, la solution est brièvement vortexée, puis centrifugée à 4100 g pendant 5 minutes à 4°C. Enfin, le surnageant est retiré et le culot maintenu à -80°C jusqu'au traitement à l'ADNase.

- Traitement à l'ADNase

La première étape du traitement à l'ADNase correspond à une incubation à 37°C pendant 30 minutes de chaque échantillon avec un mix de solution contenant 1 µl d'ADNase (Proméga, Belgique), 1 µl de tampon ADNase (Proméga, Belgique) et 8 µl d'eau *RNAse free* (Proméga, Belgique). Cette réaction de dégradation de l'ADN est ensuite stoppée grâce à l'ajout d'1 µl d'ADNase stop (Proméga, Belgique) par échantillon. Il s'en suit une incubation de 30 minutes à 37°C, puis une de 10 minutes à 65°C. Pour finir, ces solutions qui ont un volume total de 11 µl sont diluées via l'ajout de 9 µl d'eau *RNAse free* puis la concentration en ARN des échantillons est dosée à l'aide d'un nanodrop (NanoDrop 1000 spectrophotomètre, Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).

- RT-PCR

La Reverse Transcriptase (RT)-PCR est une étape permettant de transformer l'ARN des échantillons en ADN complémentaire (ADNc). Deux µg d'ARN ont été utilisés dans le cadre de cette manipulation. En premier lieu, 6 µl de solution contenant de l'ARN et de l'eau *RNAse free* ont été chauffés pendant 8 minutes à 65°C, puis un mix RT a été ajouté aux solutions. Ce mix contient 7 µl d'eau *RNAse free*, 1 µl de dNTP (Proméga, Belgique), 1 µl de M-MLV RT (Moloney Murine leukemia virus RT, ADN polymérase dépendant de l'ARN) (Proméga, Belgique), 4 µl de tampon M-MLV RT (Proméga, Belgique) et 1 µl de tampon hexamer 1/10 (Roche, Applied Biosystems, Etats-Unis). Toutefois, certains échantillons ont servi de contrôle et n'ont donc pas été mis en contact avec le mix RT détaillé ci-dessus. En effet, le M-MLV RT a été remplacé par de l'eau *RNAse free*. Chacune de ces solutions de 20 µl a ensuite été vortexée puis incubée successivement à 25°C pendant 10 minutes, 42°C pendant

50 minutes et enfin 70°C pendant 15 minutes. Enfin, les échantillons sont dilués à la suite de l'ajout de 180 µl d'eau RNase free puis conservés à - 80 °C.

- qRT-PCR

La dernière étape correspond à la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) et permet de quantifier l'expression de gènes d'intérêt. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons quantifié l'expression génique de la iNOS, la eNOS, de HIF1α et de HIF2α. La qRT-PCR débute avec la préparation d'un mix contenant des primers sens et antisens ainsi que du Sybergreen (Roche, Etats-Unis). Les primers vont se placer de façon complémentaire de part et d'autre de la séquence d'intérêt. Le Sybergreen est, quant à lui, un agent intercalent fluorescent qui va permettre de mettre en évidence l'amplification de la séquence d'ADN. Notons que le gène d'ARN ribosomal 18S a été choisi comme « *housekeeping gene* », qui est donc un gène de référence, exprimé de manière constitutive dans tous les organes. Le mix préparé de 15 µl a été déposé sur une plaque multipuits, puis 5 µl d'ADNc ont été ajoutés. La plaque est ensuite centrifugée à 1200 g pendant 3 minutes puis insérée dans la machine Real-Time PCR (7300 Real Time PCR system, Applied Biosystems, Etats-Unis). Le programme informatique utilisé est 7300 System Software.

4. Analyses morphologiques

Les analyses morphologiques ont été réalisées sur les reins droits qui ont été fixés au PAF 4%. La fixation a débuté lors de la perfusion intracardiaque avec 12 ml de PAF et s'est poursuivie avec une immersion des reins dans des bains de PAF durant 24h. Une fois fixés, les tissus ont été plongés successivement dans 3 bains d'éthanol pendant 24h, puis 3 bains de butanol le lendemain, à nouveau pendant 24h, afin de les déshydrater. Ils ont ensuite été immergés dans 3 bains de paraffine liquide à une température de 60°C à raison d'un bain par jour, puis enrobés dans des blocs de paraffine fraîche. Cette étape permet de découper des tranches de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Leica, RM2155, Allemagne). Ces coupes ont ensuite été placées sur une goutte d'eau déposée sur des lames porte-objets silanées (3-aminopropyl triméthoxysilane 98 %, Sigma, Etats-Unis) dans le but d'assurer une adhésion efficace des tissus sur les lames. Le tout a été placé sur une plaque chauffante (35°C) jusqu'à l'évaporation de la goutte d'eau. Les lames sont alors prêtes et peuvent être conservées ainsi jusqu'à leur utilisation pour effectuer des analyses histologiques et immunohistochimiques. Toutefois, avant tout traitement, les sections de reins doivent être plongées successivement dans 2 bains de toluène (Prolabo® Chemicals, France) pendant 5 minutes puis 3 bains d'éthanol 95° de 3 minutes afin de retirer la paraffine, et enfin pendant 10 minutes dans de l'eau de ville pour les réhydrater.

4.1. Coloration PAS (*Periodic Acid Schiff*)

Les analyses histologiques des reins ont été réalisées après une coloration au PAS qui met en évidence les sucres, les protéines et les glycoprotéines en les marquant en rose, facilitant ainsi la visualisation des différentes structures tissulaires.

Cette technique nécessite que les lames soient traitées comme suit :

- 8 minutes dans de l'acide périodique 1 %
- 3 minutes dans du PAS
- 10 minutes dans de l'eau de ville
- 2 minutes dans l'hémalum (Hematoxyline Mayer, J.T.Baker, Pays-Bas) qui colore les noyaux en brun clair
- 5 minutes dans de l'eau de ville
- 1 minute dans le Bleu de Luxol (0,1 % dans de l'alcool 95°, Luxol fast blue, Alfa Aesar®, Allemagne) pour mettre en évidence le cytoplasme
- 3 passages dans l'éthanol 95°, 1 passage dans le butanol et 2 dans le toluène pour déshydrater les tissus.

Les coupes sont finalement montées entre les lames et des lamelles couvre-objets et peuvent dès lors être visualisées au microscope optique.

4.2. Immunomarquage

L'immunomarquage est une technique permettant de mettre en évidence un antigène particulier dans une structure biologique. La première étape correspond au démasquage des antigènes présents dans le tissu et est effectuée à l'aide d'un tampon citrate (0,01 M à pH 6.2, 21 g d'acide citrique dans 1 L d'eau distillée) (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) ou dans de l'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, dilution 10x) (Dako Target retrieval, Dako, Danemark) en fonction de l'antigène d'intérêt.

Pour permettre une visualisation optimale des protéines ciblées, les peroxydases endogènes qui pourraient perturber l'étape ultérieure de révélation doivent être éliminées. Pour ce faire, les lames ont été immergées dans du peroxyde d'hydrogène (0,06 %, Merk, KGaA, Allemagne) pendant 5 minutes. Une goutte d'avidine (Vector Laboratories Inc., Etats-Unis) a ensuite été déposée sur les tissus pendant 15 minutes pour qu'elle se lie à la biotine endogène. Les sites non biotinylés de l'avidine ont été saturés par de la biotine (Vector Laboratories Inc., Etats-Unis) qui est ajoutée aux tissus pendant 15 minutes. Pour réduire davantage le bruit de fond, les coupes sont incubées avec de la caséine provenant de lait de bovin (Sigma, Etat-Unis). Celle-ci permet de saturer les sites aspécifiques de certains constituants tissulaires et le temps d'incubation nécessaire dépend de la protéine recherchée. Entre chaque étape, des bains de PBS ont été effectués.

L'étape suivante correspond à la pose de l'anticorps primaire spécifique de l'antigène à étudier. Il est suivi de l'anticorps secondaire biotinylé, lui-même spécifique à l'anticorps primaire (voir Tableau 3).

Au cours de la dernière étape, une amplification du signal est effectuée grâce à de la streptavidine HRP (Dako, Danemark) qui est mise en contact avec les tissus pendant 30 minutes. Ce produit contient de l'avidine qui va se lier à la biotine de l'anticorps secondaire. Ensuite, une solution de DAB (3'-diaminobenzidine, Vector Laboratories, Etats-Unis 0,05%) est ajoutée aux tissus afin d'induire la révélation de l'antigène. Celle-ci contient 0,02 % d'H₂O₂ qui va réagir avec les peroxydases tissulaires et induire l'oxydation du DAB qui précipite alors sous forme d'un composé brun visible au microscope. La réaction est ensuite stoppée en plongeant les lames dans de l'eau distillée. Enfin, une contre-coloration est réalisée avec de

l'hémalun et du bleu de luxol, et les lames sont montées comme décrit précédemment pour la coloration au PAS.

Tableau 3 : Liste des différents marquages réalisés et des anticorps primaires et secondaires correspondants

Cible	Anticorps primaires	Anticorps secondaires
Macrophages (IHC)	Rat, 1:50 ON (Abcam, Royaume-Unis)	Mouton anti-rat biotinylé, 1:50 (AbD Serotec, Royaume-Unis)
HIF1α (IF)	Lapin 1:100 ON (Abcam, Royaume-Unis)	Chèvre anti-lapin biotinylé, 1:50 (Alexa Fluor 568, Etats-Unis)
PCNA (IHC)	Lapin 1:50 ON (Abcam, Royaume-Unis)	Porc anti-lapin biotinylé, 1:50 (Dako, Danemark)
Nitrotyrosine (IHC)	Lapin 1:200 1h (MILLIPORE, Etats-Unis)	Porc anti-lapin biotinylé, 1:50 (Dako, Danemark)
Isolectine B4 (IHC)	Griffonia simplicifolia biotinylé 1:200 1h (Life technologies, Etats-Unis)	X
Pimonidazole (IHC)	Souris 1:200 ON (Hypoxypore-1 Mab1, Etats-Unis)	Chèvre anti-souris biotinylé, 1:50 (Dako, Danemark)

IHC : Immunohistochimie ; IF : Immunofluorescence ; ON : Over Night

Dans le cas d'une immunofluorescence, les anticorps secondaires sont couplés à un fluorochrome. De plus, directement après l'incubation avec les anticorps, les lames sont montées comme précédemment, à la seule différence qu'une goutte de Dapi (Prolong, Etats-Unis) est ajoutée entre les lames et les lamelles. Ce réactif induit la coloration des noyaux en bleu. La visualisation des coupes est effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

5. Analyses statistiques

Les données présentées sont des moyennes ± SEM. La comparaison entre les groupes a été effectuée par une analyse des variances (one way ANOVA) suivie par un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes (GraphPad Prism 5.00). Le seuil de signification a été défini tel que p<0,05.

Calcul de la variation du poids corporel :
[(Poids au J4 (g) – poids en J0 (g)) / Poids en J4 (g)] * 100.

Calcul du débit de filtration glomérulaire (dl/24h) :
[Ucréat (µmole/l) * V (dl/24h)] / Pcréat (µmole/l)

Calcul de l'excrétion fractionnelle de Na+ (%) :
[[UNa+ (mEq/l) * V (dl/24h)] / [PNa+ (mEq/l) * DFG (dl/24h)]] *100

L'expression des PCNA a été évaluée en comptant le nombre de noyaux positifs pour le PCNA dans les cellules tubulaires et les cellules interstitielles sur 10 champs par animal au grossissement 400X.

Le comptage des capillaires a été évalué en comptant le nombre de vaisseaux positifs pour l'isoelectine B4 sur 10 champs par animal au grossissement 400X.

La quantification des bandes obtenues à la suite des Western Blot a été réalisée par densitométrie à l'aide du programme ImageJ Macbiophotonics. Une normalisation des valeurs a ensuite été effectuée avec les bandes de la GAPDH (Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase).

Résultats

Comme précisé dans la partie introductive, le présent travail a pour but d'étudier les perturbations rénales induites par une intoxication aux AA. L'implication potentielle du NO dans le processus physiopathologique caractérisant la NAA fait également l'objet de ce travail. Pour ce faire, des analyses structurales et fonctionnelles ont été réalisées sur des souris C57Bl/6 réparties dans les groupes expérimentaux suivants : Ctl, AA, Ctl + L-Arg, AA + L-Arg.

1. Observations générales

Le Tableau 4 permet de caractériser les paramètres métaboliques des différents groupes expérimentaux via l'analyse de la quantité de nourriture ingérée, du poids corporel et du poids des reins. Il a été constaté que l'administration de AA et de L-Arg n'induit pas de changements significatifs quant à la quantité de nourriture ingérée par jour, ni en ce qui concerne le poids des reins (NS). Notons qu'au J0, le poids des souris, tous groupes confondus, était relativement identique. Toutefois, pour une même quantité de nourriture consommée, les souris qui ont reçu des AA ont pris moins de poids entre les jours J0 et J4 que les souris des groupes Ctl ($p < 0,01$: AA vs Ctl ; $p < 0,001$: AA vs Ctl + L-Arg), même lorsqu'un traitement à la L-Arg était appliqué en même temps que les injections de AA (NS : AA vs AA+L-Arg). Le poids corporel des souris des groupes Ctl suit une évolution naturelle liée à l'âge, tandis que celui des souris ayant reçu des injections de AA augmente de manière moins importante.

Tableau 4 : Quantité de nourriture ingérée par jour, variation du poids corporel et poids des reins dans les différents groupes expérimentaux au jour J4.

	Ctl (n=6)	AA (n=10)	Ctl + L-Arg (n=6)	AA + L-Arg (n=10)
Quantité de nourriture ingérée par jour (g)	$4,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,4$
Variation du poids corporel (%)	$10,2 \pm 1,7$	$3,1 \pm 0,9$ ## +++	$12,4 \pm 1,2$	$1,9 \pm 1,8$ ## +++
Poids des reins (mg)	$152,80 \pm 3,30$	$145,4 \pm 2,90$	$154,0 \pm 2,74$	$154,7 \pm 3,29$

Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ## $p < 0,01$ vs Ctl ; +++ $p < 0,001$ vs Ctl + L-Arg.

2. Fonction rénale

Afin de caractériser les perturbations de la fonction rénale qui surviennent dans des cas de NAA et l'impact d'un traitement à la L-Arg, différentes variables urinaires ont été étudiées, de manière à évaluer les capacités excrétoires et les altérations morpho-fonctionnelles rénales.

2.1. Capacité excrétoire

L'analyse de la capacité d'excrétion des reins a été effectuée via l'évaluation de la diurèse, ainsi que de l'excrétion urinaire de Na⁺ et de K⁺ qui représentent les paramètres urinaires de base (Tableau 5). En ce qui concerne la diurèse et l'osmolarité, une augmentation significative a été mise en évidence chez les souris intoxiquées aux AA par comparaison avec celle mesurée dans le groupe Ctl ($p<0,001$). Une administration de L-Arg diminue significativement ces valeurs ($p<0,001$: AA vs AA + L-Arg) qui se rapprochent alors des valeurs contrôles (NS : Ctl vs AA + L-Arg). Aucune différence significative n'a pu être détectée entre les différents groupes en ce qui concerne l'excrétion de Na⁺ et de K⁺ (NS).

Tableau 5 : Valeurs de diurèse, d'osmolarité et d'excrétion urinaire de Na⁺ et de K⁺ dans les groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4.

	Ctl (n=6)	AA (n=10)	Ctl + L-Arg (n=6)	AA + L-Arg (n=10)
Diurèse (ml/24h)	1,1 ± 0,2	2,5 ± 0,2 ### +++	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1 ***
Osmolarité (mOsm/kg)	4873 ± 4301	2210 ± 137### +++	5353 ± 469	5232 ± 595***
Excrétion Na ⁺ (μEq/24h)	227 ± 36	291 ± 14	293 ± 36	248 ± 30
Excrétion K ⁺ (μmEq/24h)	460 ± 84	553 ± 26	617 ± 78	438 ± 51

Résultats = moyennes ± SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ### $p<0,001$ vs Ctl ; *** $p<0,001$ vs AA ; +++ $p<0,001$ vs Ctl + L-Arg.

2.2. Altérations fonctionnelles

Des données fonctionnelles ont été obtenues à partir d'analyses effectuées sur les reins, l'urine et le plasma des souris réparties dans les différents groupes expérimentaux. Ces données comprennent les valeurs de créatinine plasmatique et urinaire, de DFG, de protéinurie, de glucosurie et de FE_{Na} (excrétion fractionnelle de Na⁺). La mesure des concentrations plasmatique et urinaire en créatinine permet d'évaluer le DFG, considéré comme étant équivalent à la clairance rénale de la créatinine. Cette molécule provient de la dégradation de la créatine musculaire. Elle est excrétée de façon constante par le rein, principalement par le processus de filtration glomérulaire. Chez les souris traitées aux AA, la créatinine plasmatique augmente de façon importante par rapport aux souris Ctl (Figure 10A), tandis que la créatinine urinaire diminue fortement ($p<0,001$) (Figure 10B). Ceci indique une perturbation du DFG qui est fortement réduit lors d'une intoxication aux AA, comme représenté sur la Figure 10C. Un traitement à la L-Arg entraîne une diminution de la créatinine plasmatique et une augmentation significative de la créatinine urinaire ($p<0,01$: AA vs AA + L-Arg) en cas de NAA. En revanche, le DFG, quant à lui, ne semble pas être influencé par la L-Arg.

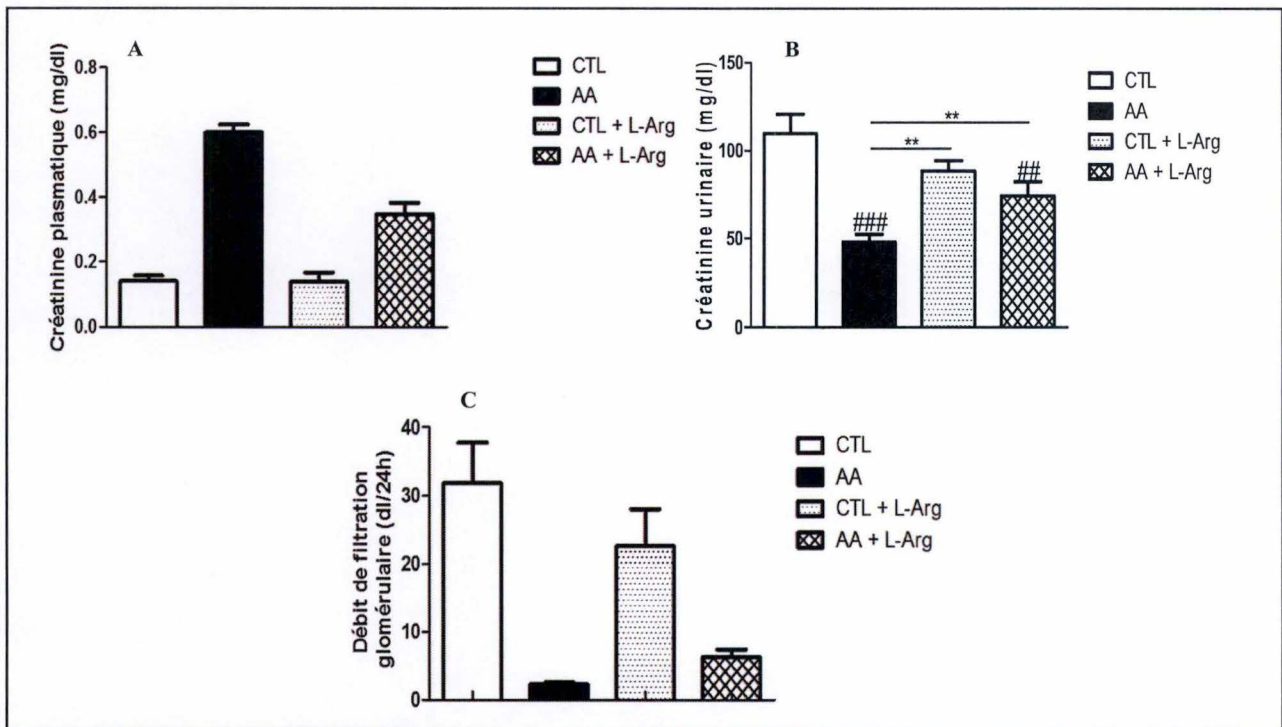


Figure 10 : A) Créatinine plasmatique des groupes Ctl (n=2), AA (n=4), Ctl + L-Arg (n=2) et AA + L-Arg (n=5) au jour J4. B) Créatinine urinaire des groupes Ctl (n=8), AA (n=14), Ctl + L-Arg (n=8) et AA + L-Arg (n=15) au jour J4. C) Débit de filtration glomérulaire des groupes Ctl (n=2), AA (n=4), Ctl + L-Arg (n=2) et AA + L-Arg (n=5) au jour J4.

Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ## $p < 0,01$ et ### $p < 0,001$ vs Ctl ; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ entre les groupes.

La Figure 11A illustre l'excrétion urinaire de protéines dans les différents groupes expérimentaux. Les valeurs obtenues apportent des informations sur les altérations concernant la filtration glomérulaire et/ou la réabsorption tubulaire. L'analyse de la protéinurie révèle une augmentation des valeurs de près de 20 fois chez les souris ayant reçu des AA (45 mg/24h) par rapport aux Ctl (3 mg/24h) ($p < 0,001$: AA vs Ctl). Un traitement à la L-Arg induit une diminution significative de ces valeurs ($p < 0,001$: AA vs AA + L-Arg).

En conditions normales, le glucose n'est pas excrété car le rein assure sa réabsorption. Toutefois, une glucosurie peut être observée en cas d'hyperglycémie ou suite à des altérations tubulaires. La Figure 11B montre des valeurs 65 fois plus importantes chez les souris traitées aux AA que chez les Ctl ($p < 0,001$). Une administration de L-Arg aux souris recevant des injections de AA entraîne une diminution significative de la glucosurie ($p < 0,001$: AA vs AA + L-Arg).

Enfin, la mesure de FE_{Na} , illustrée à la Figure 11C, permet de caractériser la fonction tubulaire. En cas de NAA, FE_{Na} est significativement plus important que dans les conditions contrôles ($p < 0,001$). Une administration de L-Arg permet de diminuer ces valeurs de façon significative ($p < 0,001$: AA vs AA + L-Arg).

Enfin, la Figure 11 montre qu'aucune différence significative au niveau des valeurs de protéinurie, de glucosurie et de FE_{Na} n'a pu être mise en évidence entre les groupes Ctl et les Ctl + L-Arg (NS : Ctl vs Ctl + L-Arg).

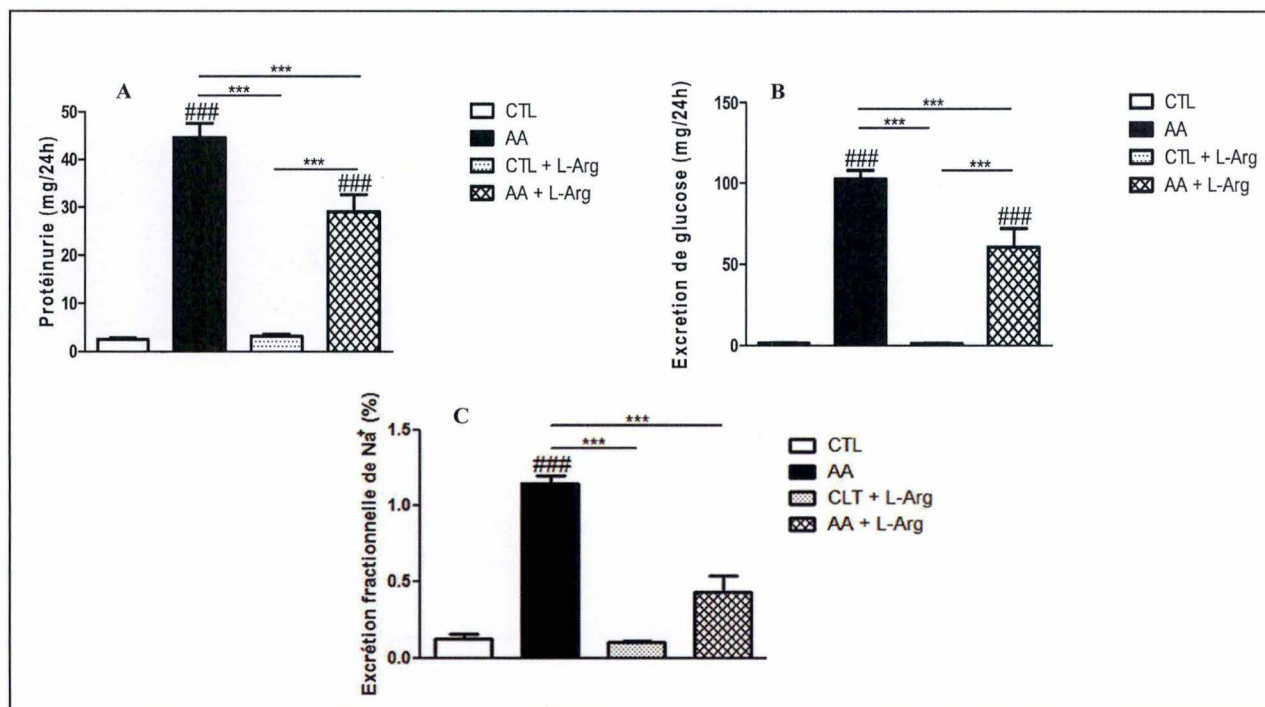


Figure 11 : A) Protéinurie des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. B) Excrétion de glucose des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. C) Excrétion fractionnelle de Na⁺ des groupes Ctl (n=2), AA (n=4), Ctl + L-Arg (n=2) et AA + L-Arg (n=5) au jour J4.

Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ## p<0,01 et ### p<0,001 vs Ctl ; * p<0,1, ** p<0,01 et *** p<0,001 entre les groupes.

3. Caractérisation des lésions tubulaires et prolifération cellulaire

3.1. Analyses histologiques

Une coloration au PAS a été effectuée sur les tissus rénaux des souris afin de réaliser des analyses histologiques. La Figure 12 illustre les altérations morphologiques induites par les AA. Comme représenté sur l'image 12C, les lésions sont principalement localisées au niveau des tubules proximaux présents dans l'OSOM. Comparées aux cellules des tubules proximaux des groupes Ctl et Ctl + L-Arg, celles des souris traitées aux AA sont nécrotiques et présentent une perte progressive de leur bordure en brosse. De plus, ces cellules n'adhèrent plus correctement aux membranes basales (Figure 12D, H), contrairement aux cellules des groupes Ctl (Figure 12B, F). Les lumières des tubules sont alors encombrées par des débris cellulaires, mais également par des concentrations importantes en protéines (Figure 12C). L'intensité des lésions tubulaires est atténuée dans le groupe AA + L-Arg (Figure 12G, H). En effet, la structure des cellules est généralement mieux préservée. De plus, moins de tubules nécrotiques

présentant des lumières obstruées par des débris cellulaires ou des protéines sont observés. Cette constatation est soutenue par un score de nécrose préalablement mesuré dans notre laboratoire (résultats non représentés). En effet, ce score est plus faible dans le groupe AA + L-Arg que dans le groupe AA. Aucune différence n'est observée entre les groupes Ctl et Ctl + L-Arg.

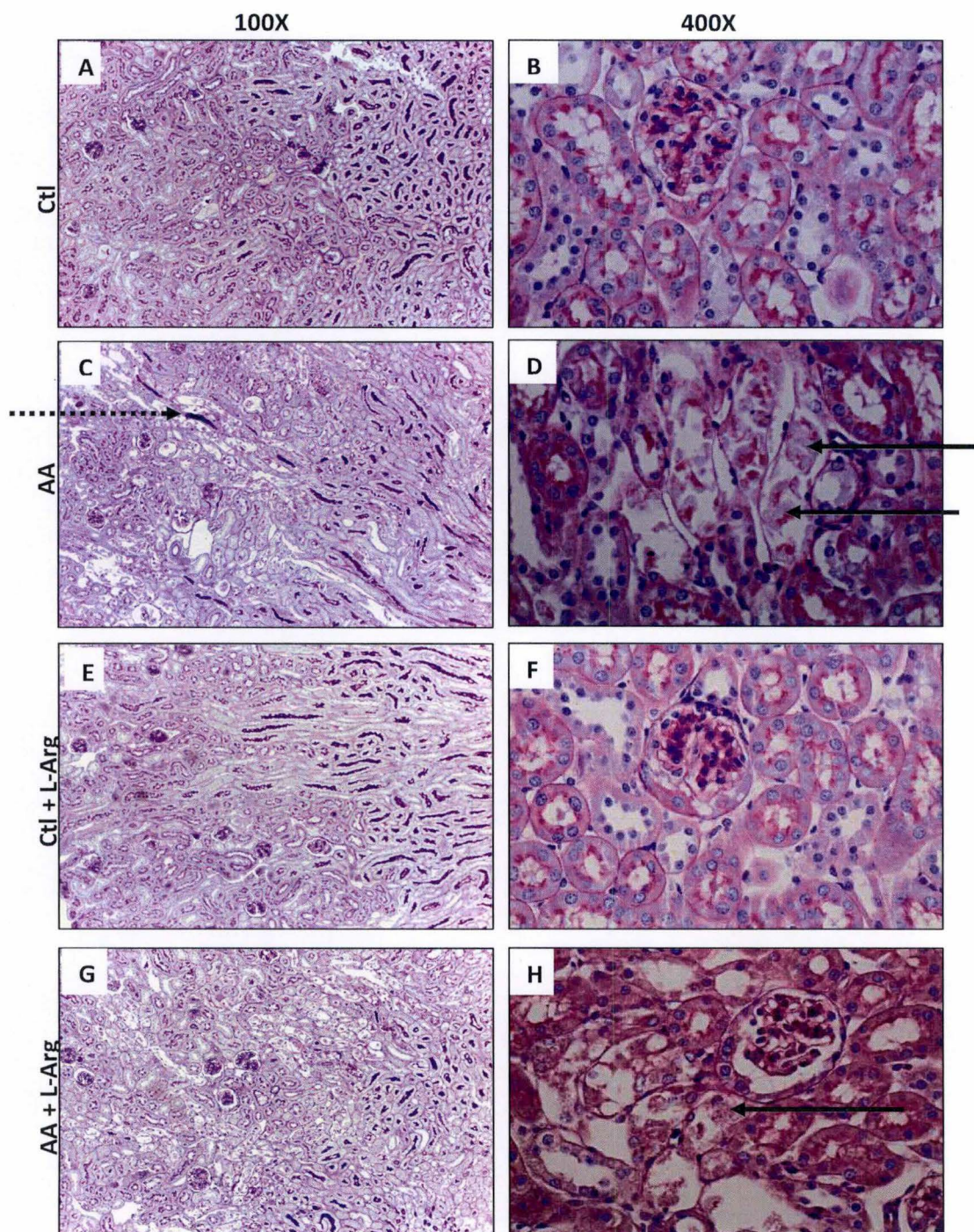


Figure 12 : Coloration au PAS des tissus rénaux des groupes Ctl (A, B), AA (C, D), Ctl + L-Arg (E, F) et AA + L-Arg (G, H) obtenus au jour J4. Grossissements : 100X (A, C, E, G) et 400X (B, D, F, H).

.....→ Accumulation de protéines dans la lumière tubulaire

→ Débris cellulaires dans la lumière des tubules nécrotiques

L'analyse de l'excrétion de la NAG est utilisée afin d'estimer les perturbations tubulaires. Cette enzyme de haut poids moléculaire est abondamment présente dans les lysosomes des cellules des tubules proximaux. Sa détection dans les urines est la conséquence de lésions au niveau de ces cellules. Comme illustré sur la Figure 13, une augmentation significative des concentrations urinaires en NAG est observée suite à l'administration des AA ($p < 0,01$ vs Ctl). Ces valeurs sont réduites par une administration de L-Arg et deviennent ainsi similaires à celles des groupes Ctl (NS : AA + L-Arg vs Ctl).

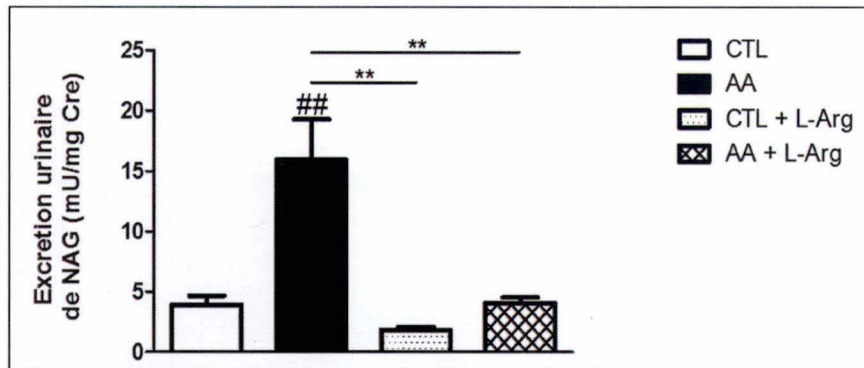


Figure 13 : Excrétion de NAG des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ## $p < 0,01$ vs Ctl ; ** $p < 0,01$ entre les groupes.

3.2. Evaluation du processus de prolifération cellulaire

La Figure 14 représente les différences existant entre les différents groupes de souris en ce qui concerne l'expression de PCNA au niveau de l'interstitium et des tubules rénaux. Le PCNA étant le cofacteur de la polymérase, ce marquage immunohistochimique permet d'évaluer la prolifération cellulaire. Comme indiqué sur la Figure 13, le nombre de cellules exprimant le PCNA augmente de façon significative en cas d'intoxication aux AA ($p < 0,01$ vs Ctl). Aucune différence significative n'a été induite par un traitement à la L-Arg (NS : Ctl vs Ctl + L-Arg ; NS : AA vs AA + L-Arg).

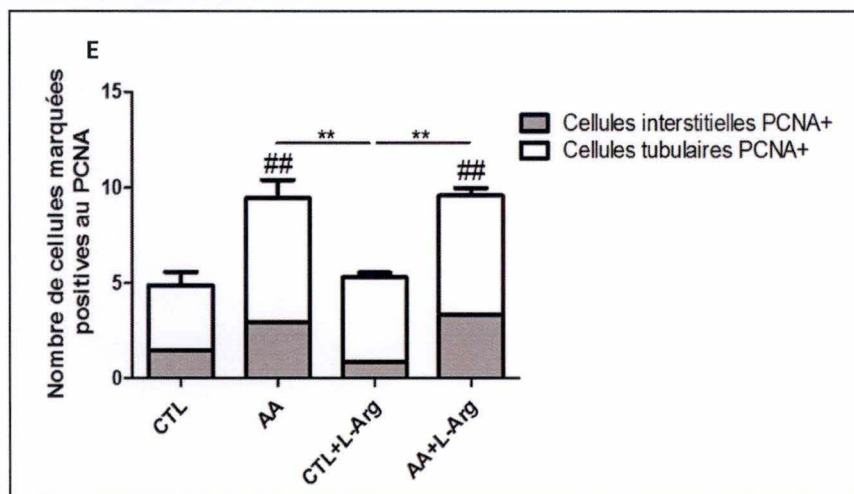
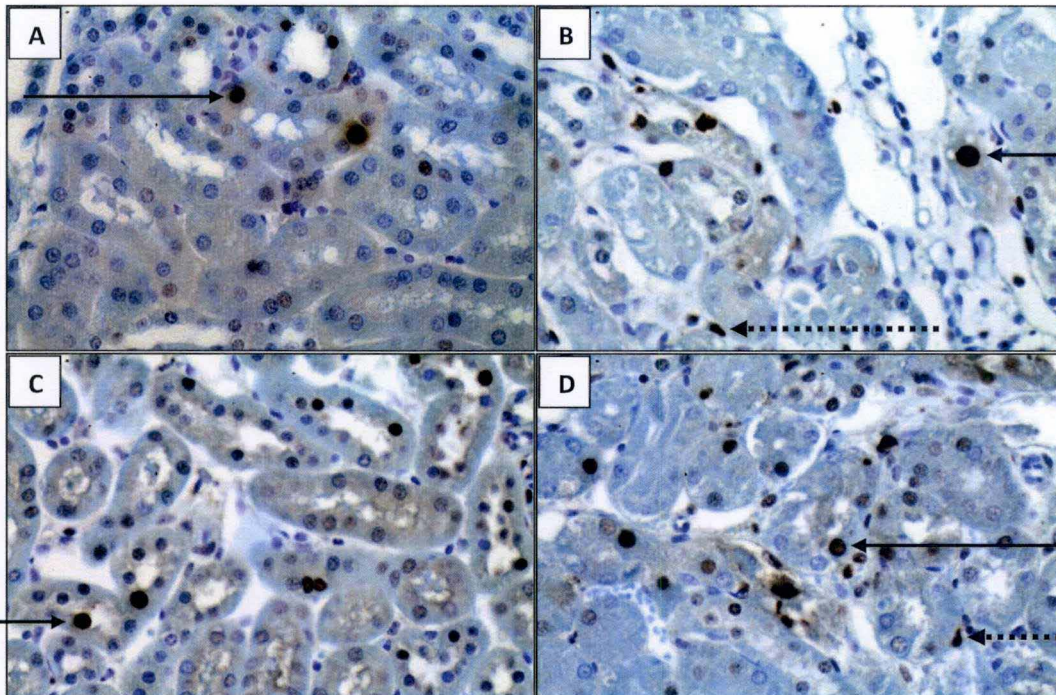


Figure 14 : A-B-C-D) Immunomarquage du PCNA sur des tissus rénaux des groupes Ctl (n=6) (A), AA (n=10) (B), Ctl + L-Arg (n=8) (C) et AA + L-Arg (n=10) (D) au jour J4. Grossissement : 400X.

.....→ Cellules interstitielles

→ Cellules tubulaires

E) Semi-quantification du nombre de cellules interstitielles et rénales marquées à l'anticorps anti-PCNA chez les souris des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Grossissement 400X. Résultats = moyennes ± SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ## p<0,01 vs Ctl ; ** p<0,01 entre les groupes.

4. Etude de l'inflammation

L'inflammation tissulaire a été évaluée à l'aide d'une analyse semi-quantitative du nombre de macrophages présents dans les reins des souris (Figure 15A). L'analyse de ces résultats indique une tendance à l'augmentation du nombre de macrophages tissulaires chez les souris traitées aux AA. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes durant cette phase aiguë de la NAA (NS). Dans un second temps, un dosage des concentrations en MCP-1 dans les tissus rénaux a été effectué (Figure 15B). Ce dosage a permis de constater qu'une intoxication aux AA induit une augmentation significative des concentrations en MCP-1 intra-rénal, qui n'est pas influencée par une administration de L-Arg ($p < 0,001$: AA vs Ctl ; NS : AA vs AA + L-Arg).

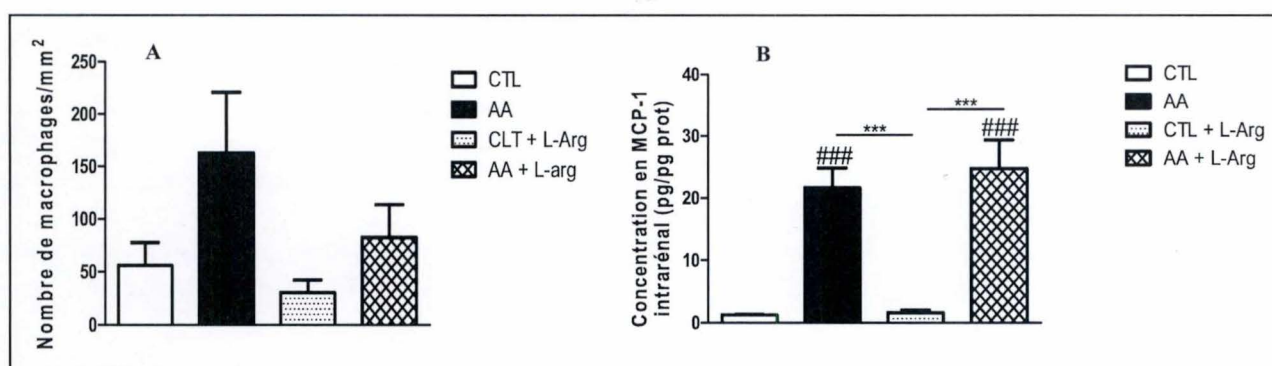


Figure 15 : A) Semi-quantification du nombre de macrophages par mm² de tissu rénal des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. B) Concentration en MCP-1 des tissus rénaux des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ### $p < 0,001$ vs Ctl ; *** $p < 0,001$ entre les groupes.

5. Monoxyde d'azote et NO synthases

5.1. Excrétion des métabolites du NO

Le NO est une molécule de signalisation qui intervient dans la régulation de l'homéostasie et du tonus vasculaire. Afin d'analyser les variations de sa biodisponibilité qui pourraient exister entre les différents groupes expérimentaux, un dosage des nitrites et des nitrates (NOx) urinaires a été réalisé. Les NOx correspondent aux produits de la métabolisation du NO et sont plus stables que ce dernier. Comme représenté sur la Figure 16, les injections de AA sont à l'origine d'une diminution significative de l'excrétion des NOx ($p < 0,001$ vs Ctl). Une administration de L-Arg augmente ces concentrations qui deviennent alors similaires aux valeurs contrôles (NS : Ctl vs AA + L-Arg). Par ailleurs, l'administration de L-Arg chez des animaux contrôles ne semble pas avoir d'effet sur la biodisponibilité en NO (NS : Ctl vs Ctl + L-Arg).

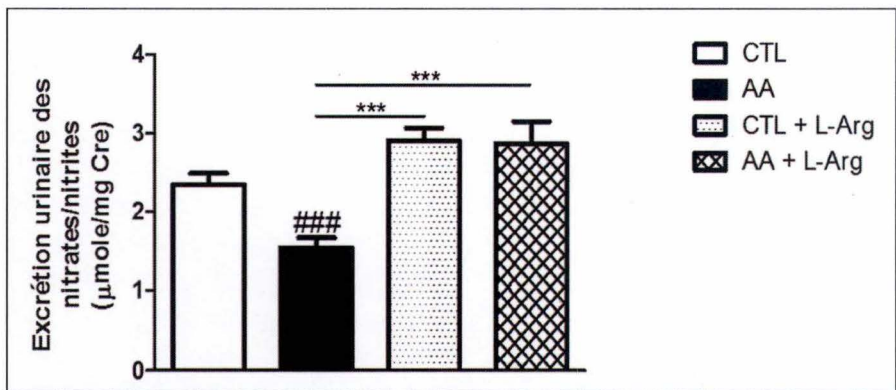


Figure 16 : Concentration en nitrates/nitrites urinaires des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Les résultats sont les moyennes \pm SEM. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : ### p<0,001 vs Ctl ; *** p<0,001 entre les groupes.

5.2. Expression génique de eNOS et de iNOS

Les NOS sont des enzymes qui catalysent la synthèse du NO en utilisant de la L-Arg et de l'oxygène comme substrats. L'expression génique de deux isoformes de NOS a été étudiée dans le cadre de ce travail, à savoir celle de la eNOS et de la iNOS. La Figure 17 montre qu'aucune différence de l'expression relative d'ARNm n'a été observée entre les différents groupes expérimentaux, aussi bien pour la eNOS que pour la iNOS.

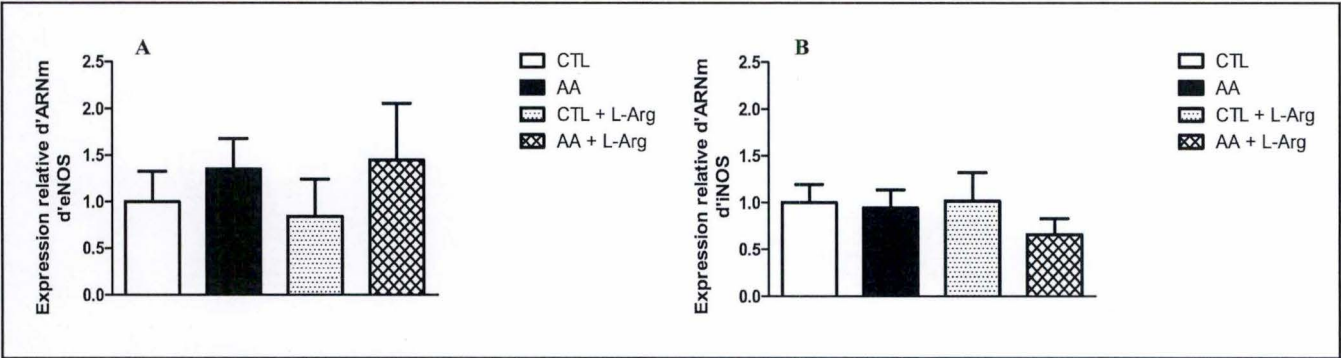


Figure 17 : A) Expression relative d'ARNm d'eNOS dans les tissus rénaux des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. B) Expression relative d'ARNm d'iNOS dans les tissus rénaux des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : NS.

6. Caractérisation du compartiment vasculaire

L'isoelectine B4 est une lectine pouvant former des liaisons avec des polysaccharides ou des protéines. Son marquage permet la mise en évidence du compartiment vasculaire. Comme illustré sur la Figure 18, aucune différence significative dans l'expression de l'isoelectine B4 n'a pu être mise en évidence entre les différents groupes de souris (NS).

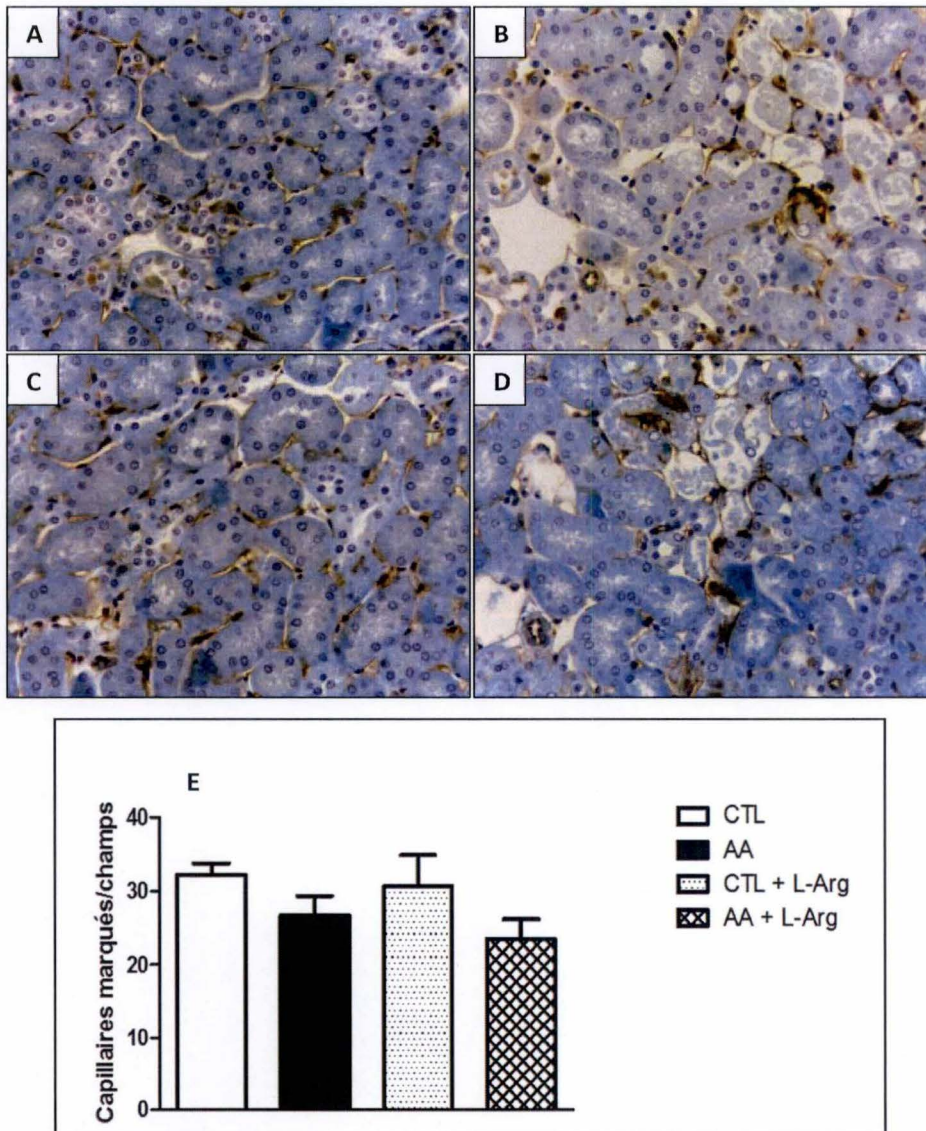


Figure 18 : A-B-C-D) Immunomarkage de l'isolectine B4 sur des tissus rénaux des groupes Ctl (n=6) (A), AA (n=10) (B), Ctl + L-Arg (n=8) (C) et AA + L-Arg (n=10) (D) au jour J4. Grossissement : 400X. E) Semi-quantification du nombre de vaisseaux marqués à l'isolectine B4 par champs de tissu rénal des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : NS.

7. Evaluation de l'hypoxie intra-rénale

7.1. Expressions protéique et génique de HIF-1 α

HIF-1 α est une des isoformes du facteur HIF qui est impliqué dans la transcription de gènes en réponse à l'hypoxie. Sa dégradation est induite en condition de normoxie. La Figure 19A ne montre pas de différence entre les groupes expérimentaux quant au marquage par immunofluorescence de l'isoforme HIF-1 α . L'analyse de l'expression génique de cette molécule n'indique pas non plus de différence entre les groupes (Figure 19B).

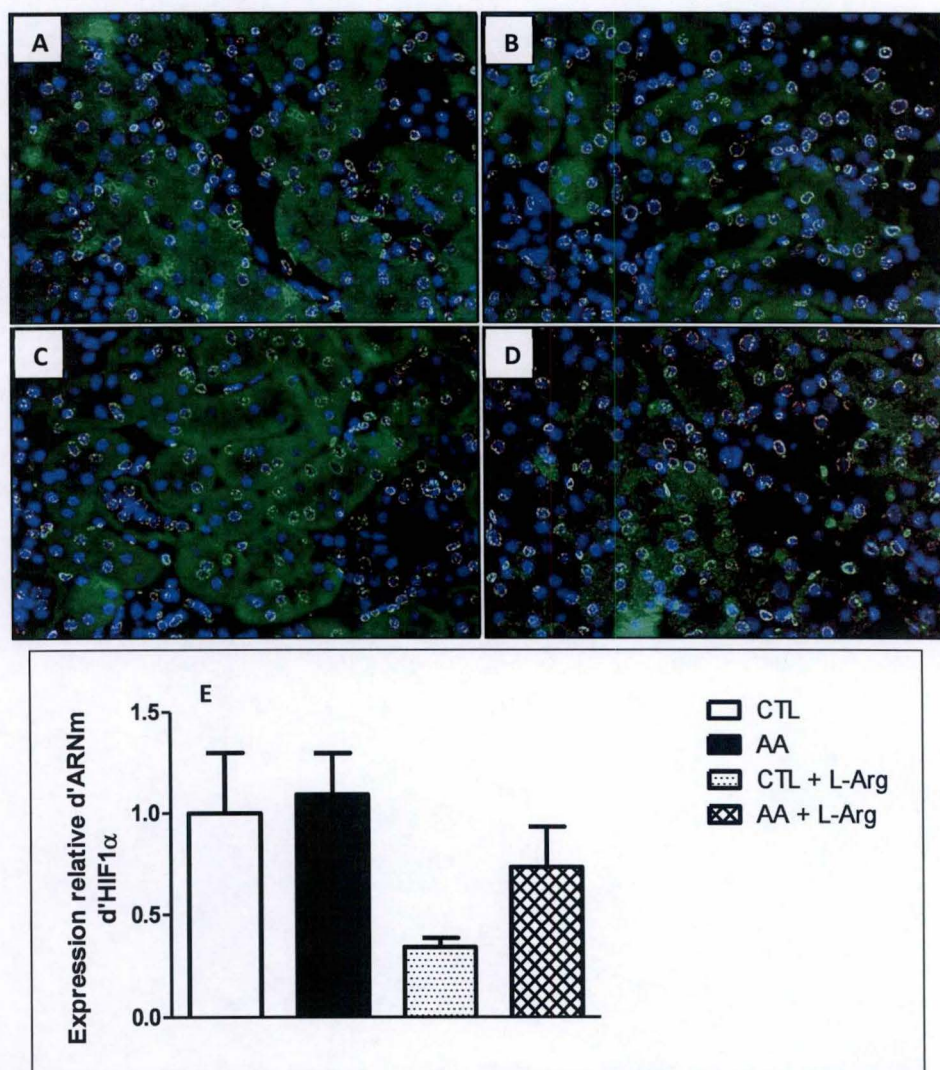


Figure 19 : A-B-C-D) Immunofluorescence de HIF-1 α dans les tissus rénaux des groupes Ctl (n=6) (A), AA (n=10) (B), Ctl + L-Arg (n=8) (C) et AA + L-Arg (n=10) (D) au jour J4. Grossissement : 400X. E) Expression relative d'ARNm de HIF-1 α dans les tissus rénaux des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : NS.

7.2. Expression génique de HIF2 α

HIF-2 α est une autre des isoformes du facteur HIF. Une fois de plus, l'analyse de l'expression génique de cette isoforme ne montre pas de différence significative entre les groupes expérimentaux (Figure 20).

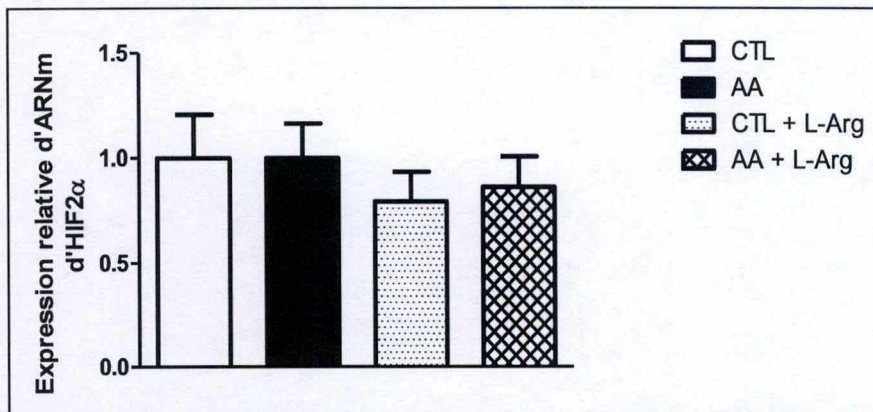


Figure 20 : Expression relative d'ARNm de HIF-2 α dans les tissus rénaux des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : NS.

7.3. Expression génique de VEGF

Le VEGF est un facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire. Comme l'illustre la Figure 21, aucune différence significative n'a pu être détectée entre les groupes expérimentaux quant à l'expression génique du VEGF.

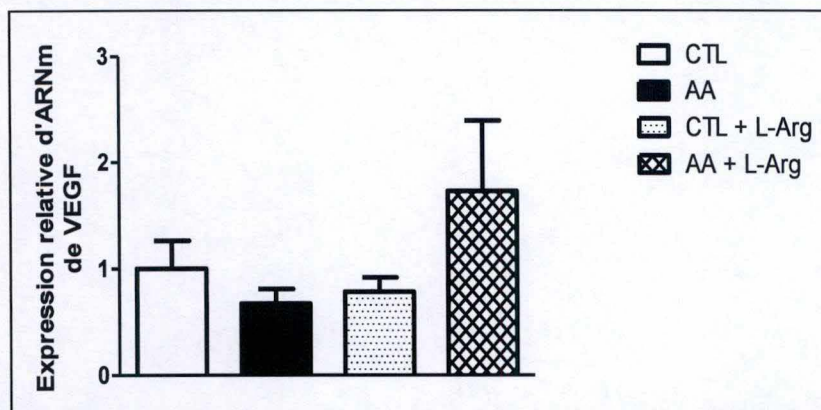


Figure 21 : Expression relative d'ARNm de VEGF dans les tissus rénaux des groupes Ctl (n=6), AA (n=10), Ctl + L-Arg (n=6) et AA + L-Arg (n=10) au jour J4. Résultats = moyennes \pm SEM. Evaluations statistiques : one way ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les groupes : NS.

Discussion

La néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) est une maladie rénale progressive survenant suite à une intoxication aux AA. Ceux-ci induisent de sévères lésions tubulaires qui ont des répercussions autant au niveau structurel que fonctionnel. Cette atteinte rénale est caractérisée par une phase aiguë et une phase chronique, et peut mener, à terme, au développement de lésions cancéreuses. De plus en plus de cas de NAA sont répertoriés dans le monde mais la prévalence de cette néphropathie reste fortement sous-estimée (Debelle et al., 2008). Les mécanismes impliqués dans la progression de cette maladie ne sont cependant pas encore suffisamment élucidés. A de nombreuses reprises, des chercheurs ont tenté de la caractériser, que ce soit dans la phase aiguë ou dans la phase chronique. Il a notamment été établi que cette néphropathie s'accompagne d'une diminution significative de la biodisponibilité en NO intra-rénal (Debelle et al., 2002) (Lebeau et al., 2005) (Wen et al., 2008). Or, le NO est un vasodilatateur important qui joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie et du tonus vasculaire (Fleming and Busse, 1999). La littérature montre qu'un déséquilibre entre les agents vasoactifs est associé à des perturbations du système vasculaire, ce qui peut induire le développement d'une ischémie tissulaire (Rabelink et al., 2007). De plus, cette dernière est responsable de la progression de nombreuses maladies rénales (Lameire and Vanholder, 2004) (Basile et al., 2012). Dès lors, dans le cadre de ce mémoire, nous avons émis l'hypothèse que ce déséquilibre entre les agents vasoactifs pourrait être un élément clé dans la physiopathologie de la NAA et qu'il pourrait être à l'origine d'une ischémie toxique au sein du tissu rénal.

Pour poursuivre notre objectif, notre approche expérimentale a consisté à administrer de la L-Arg à des souris atteintes de NAA dans le but d'augmenter la biodisponibilité du NO. Dans ce contexte, nous avons mesuré les concentrations urinaires en NO dans les différents groupes expérimentaux et nous avons ainsi constaté qu'un apport exogène de L-Arg permettait d'augmenter de façon significative l'excrétion du NO chez les souris intoxiquées aux AA. Cette observation a également été rapportée dans d'autres études portant sur des modèles de néphrotoxicité aiguë induite par de la cyclosporine (Mansour et al., 2002) (Kurus et al., 2005). Sur base de ces résultats, nous avons donc été en mesure de tester l'hypothèse selon laquelle une augmentation de la biodisponibilité du NO pourrait améliorer la fonction rénale en cas de NAA via ses nombreuses fonctions, mais plus particulièrement grâce à son effet vasoactif.

1. Etude des altérations morpho-fonctionnelles rénales

Pour cette première partie du mémoire, nous nous sommes intéressés à l'analyse de quelques paramètres généraux. En premier lieu, l'évaluation de la quantité de nourriture ingérée par jour n'a montré aucune différence entre le groupe contrôle et le groupe traité aux AA. Peu d'articles dans la littérature rapportent des informations au sujet de la prise de nourriture au cours de la phase aiguë de la NAA. Toutefois, il a été montré qu'après plus de 17 mois d'intoxication avec des AA, des lapins consommaient une plus faible quantité de nourriture que les lapins des groupes contrôles. Ce phénomène serait lié à l'apparition de lésions gastriques et d'une fibrose intestinale, et observable uniquement durant la phase chronique de la maladie (Cosyns et al., 2001). Notre étude nous a également permis de constater que des injections de AA ont un impact sur la prise de poids et peuvent la réduire de façon significative, ce qui concorde avec des résultats obtenus chez le rat au cours de la phase aiguë de la néphropathie (Zhang et al., 2006) (Chan and Cai, 2008). Sur base de ces données, il a été suggéré qu'une perturbation de l'activité des enzymes impliquées dans les voies métaboliques, ainsi qu'une

réabsorption tubulaire insuffisante, pourraient justifier une prise de poids atténuée. Dans notre modèle, l'administration de L-Arg n'a pas eu d'effet sur ce paramètre. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les AA ont un vaste champ d'action, la majorité de leurs effets étant encore inconnus. En ce qui concerne le poids des reins, aucune différence n'a été observée entre les différents groupes expérimentaux. Dans la littérature, lorsque l'on observe une réduction du poids des reins en cas de NAA, la maladie se situe dans une phase chronique. C'est le cas pour des reins de souris qui ont été intoxiquées pendant deux semaines (Huang et al., 2013a) ainsi que pour des biopsies humaines de patientes ayant reçus des AA des années auparavant (Reginster et al., 1997). Etant donné que notre modèle expérimental correspond à une atteinte aiguë, il est compréhensible que de telles variations dans le poids des reins n'aient pas été constatées.

Après ces quelques observations générales, nous avons analysé les effets des AA sur la fonction rénale. En ce qui concerne l'analyse de la capacité excrétoire, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'impact que présentent les AA sur la diurèse. Nos résultats suggèrent que ces toxiques provoquent l'augmentation du volume urinaire, ce qui correspond à une polyurie. L'urine est alors fortement diluée, induisant alors une diminution de l'osmolarité. Ceci a été observé par de nombreuses autres équipes de chercheurs qui ont injecté des AA à des rats, que ce soit durant quelques jours ou quelques semaines (Debelle et al., 2002) (Cui et al., 2005) (Chan and Cai, 2008). Des lésions tubulaires induisant des perturbations de la réabsorption d'eau, d'ions et de protéines peuvent être à l'origine de ce phénomène (Pitts and Masson, 1976). Dans notre étude, une administration de L-Arg chez les souris traitées aux AA induit une diminution de la diurèse qui devient alors similaire à celle des souris des groupes contrôles, associée à une augmentation de l'osmolarité. L'excrétion d'ions (Na^+ et K^+) a également été analysée dans le cadre de ce travail. Aucune différence n'a été observée entre les souris contrôles et celles qui ont reçu des AA. Des études effectuées sur des rats ont toutefois montré que durant la phase chronique de la maladie, la concentration de ces ions dans les urines est significativement réduite (Peters and Hedwall, 1963) (Yeh et al., 2008). En effet, des lésions au niveau des cellules tubulaires perturbent le fonctionnement des pompes Na/K/ATPase. Le transport de ces ions serait par conséquent réduit (Pitts and Masson, 1976).

Concernant l'étude des altérations fonctionnelles induites par les AA au niveau du rein, les concentrations en créatinine plasmatique et urinaire ont été mesurées, ainsi que le DFG. Pour rappel, la créatinine est le produit de la créatine musculaire. En conditions physiologiques, l'excrétion de cette molécule est constante car elle est librement filtrée par les glomérules, est très peu sécrétée et n'est pas réabsorbée. Les souris qui ont reçu des injections de AA présentaient des concentrations en créatinine urinaire plus faible que les souris des groupes contrôles, tandis que les concentrations en créatinine plasmatique étaient plus importantes. Le DFG qui est calculé sur base de la formule de la clairance rénale de la créatinine est un outil permettant d'évaluer la fonction rénale et plus précisément la filtration glomérulaire. Nous avons constaté une diminution importante de celui-ci en cas de NAA, ce qui témoigne d'une insuffisance rénale (Jacob, 2007). Notons qu'aucune analyse statistique n'a pu être effectuée avec ces derniers résultats car nous ne disposions que d'un faible nombre d'échantillons plasmatiques différents. Toutefois, les tendances que nous avons obtenues correspondaient à nos attentes et des résultats similaires avaient déjà été générés dans notre laboratoire (Martin, Master BBMC 2013-2014, UNamur). De plus, ces informations concordent avec celles de nombreuses études effectuées aussi bien sur des rats que sur des souris atteints de NAA aiguë (Debelle et al., 2002) (Sato et al., 2004) (Lebeau et al., 2005). Concernant la L-Arg, nous avons remarqué qu'elle induisait une tendance vers une augmentation du DFG chez les souris atteintes de NAA. Les effets de la L-Arg sur le DFG ont également été étudiés par Mansour et al. (2002)

qui ont intoxiqué des rats avec de la cyclosporine. En effet, ils ont pu constater qu'un traitement à l'aide de L-Arg augmente de façon significative le DFG et permet donc une amélioration de la fonction rénale via un mécanisme dépendant du NO (Mansour et al., 2002).

Afin d'étudier plus en détail les perturbations de la fonction rénale survenant durant la phase aiguë de la NAA, nous avons analysé la protéinurie, la glycosurie et la FE_{Na} . Une protéinurie massive a été observée chez les souris des groupes AA par rapport aux contrôles, ce qui peut traduire des altérations de la filtration glomérulaire et/ou de la réabsorption tubulaire. Pour mieux comprendre le phénomène à l'origine d'une telle excrétion protéique, nous avons analysé la glycosurie et avons constaté qu'à nouveau, les souris traitées aux AA présentent une augmentation significative de la concentration de glucose dans les urines. Cette information est intéressante car le glucose est une molécule filtrée librement par le glomérule pour ensuite être totalement réabsorbée par le tubule proximal en conditions physiologiques. Sa présence dans les urines témoigne donc de l'existence de lésions au niveau des cellules tubulaires proximales. La FE_{Na} a également permis d'évaluer la fonction rénale car les tubules sont impliqués dans la réabsorption active du Na^+ . L'excrétion fractionnelle correspond au pourcentage de Na^+ filtré par le rein, qui sera ensuite excrété dans les urines. Comme nous avons pu le constater, la FE_{Na} augmente de façon significative lors d'une intoxication aux AA. Le Na^+ n'est donc plus réabsorbé correctement. Ensemble, l'excrétion excessive de protéines, de glucose ainsi que l'augmentation de la FE_{Na} renforcent l'hypothèse que les AA sont à l'origine de troubles majeurs au niveau des tubules proximaux, ce qui induit des perturbations de la réabsorption tubulaire. Notons que le transport actif du Na^+ est à l'origine de la réabsorption passive d'eau. Par conséquent, une augmentation de la FE_{Na} implique une perturbation de la réabsorption d'eau et donc une polyurie, mise en évidence au cours de notre étude.

Des résultats similaires sont retrouvés dans la littérature (Nortier et al., 1997) (Lebeau et al., 2005) (Zhang et al., 2006). En effet, Zhang et al. (2006), qui ont injecté des AA (2,5 mg/kg) à des rats pendant 5 jours, soutiennent qu'une augmentation de l'excrétion de sucre et d'acides aminés est liée à l'incapacité de réabsorber des composés de faible poids moléculaires et souligne donc une atteinte des tubules proximaux. Nortier et al. (1997) poussent leurs analyses plus loin et constatent que les protéines des cellules de Clara, le *retinol binding protein*, les $\beta 2$ -microglobulines et les $\alpha 1$ -microglobulines font partie des microprotéines filtrées dont la réabsorption est entravée. Celles-ci se retrouvent donc abondamment dans les urines.

En ce qui concerne l'implication du NO au niveau de la fonction rénale, nous avons constaté qu'une administration de L-Arg en cas de NAA diminue de façon significative l'excrétion de protéines, de glucose et la FE_{Na} . Cela revient à dire qu'une plus grande biodisponibilité en NO est bénéfique pour la fonction rénale. Cette constatation a également été effectuée par Kurus et al. (2005) au cours d'études réalisées sur des rats atteints de néphropathie causée par de la cyclosporine (Kurus et al., 2005).

Après avoir analysé les altérations de la fonction rénale, nous pouvons constater que notre modèle murin de NAA présente les mêmes altérations que celles que l'on retrouve dans la littérature. Afin de se concentrer davantage sur l'impact qu'exercent les AA sur les tubules proximaux, nous avons entrepris d'analyser les lésions structurelles ainsi que la prolifération cellulaire, qui correspond à la réponse des tubules face à une agression. En premier lieu, une coloration au PAS a été effectuée sur les tissus rénaux des différents groupes expérimentaux afin d'en analyser la structure. Tandis que la structure tissulaire des souris contrôles est conforme à la normale, d'importantes lésions, qui sont principalement localisées dans l'OSOM,

au niveau des tubules proximaux, sont observées chez les souris traitées aux AA. Les cellules sont nécrotiques et présentent une perte progressive de leur bordure en brosse. De plus, elles n'adhèrent plus correctement aux membranes basales et se retrouvent dans les lumières des tubules. Ces lumières sont également encombrées par des concentrations importantes en protéines dont la réabsorption est altérée. Un score de nécrose réalisé au préalable dans notre laboratoire nous a permis de confirmer les signes de nécrose plus importants chez les souris intoxiquées aux AA que chez les souris contrôles (Martin, Master BBMC 2013-2014, UNamur).

Cette nécrose tubulaire massive au niveau de la partie droite (*pars recta*) des tubes proximaux a également été observée dans d'autres études, aussi bien sur des biopsies humaines que chez des lapins et des rats (Liu et al., 2003) (Sato et al., 2004) (Cui et al., 2005) (Simoes et al., 2008). Ces lésions tubulaires causées par les AA induisent une excrétion importante de la NAG qui est une protéine localisée dans les lysosomes des tubules proximaux (Skalova, 2005). Les équipes de Nortier et al. (1997) et de Lebeau et al. (2005) ont, en plus, analysé l'excrétion de l' α -GST (α -glutathione *S*-transferase), une enzyme du cytoplasme tubulaire ainsi que la LAP (leucine aminopeptidase) et la NEP (neutral endopeptidase), toutes deux localisées au niveau de la bordure en brosse des segments S3 du tubule proximal (Nortier et al., 1997) (Lebeau et al., 2005). Ces chercheurs ont également pu constater une excrétion de protéines tubulaires plus importante chez les souris qui ont reçu des injections de AA, ce qui soutient l'existence d'une nécrose sévère des cellules proximales, plus particulièrement au niveau du segment S3. Ces résultats concordent avec les données fonctionnelles que nous avons rapportées précédemment. En effet, nous pouvons voir que la nécrose tubulaire aiguë induite par les AA génère des troubles importants de la réabsorption rénale. Ces acides s'accumulent principalement au niveau du segment S3 des tubules proximaux en raison de la présence de nombreux OAT et de l'importante activité métabolique de ce segment (Brezis and Rosen, 1995). En effet, Baudoux et al. (2012), qui ont injecté des AA à des souris pendant environ une semaine, ont pu constater que des injections de probénécide, une molécule inhibitrice des OAT qui prévient l'accumulation de AA au sein des cellules proximales, réduit considérablement les atteintes rénales (Baudoux et al., 2012).

Par ailleurs, sur base des coupes histologiques, nous avons pu observer que les glomérules ne semblent pas subir une atteinte toxique des AA. Cette constatation a été effectuée par de nombreux chercheurs travaillant sur divers modèles de NAA chez le rat (Liu et al., 2003) (Sato et al., 2004) (Cui et al., 2005) (Simoes et al., 2008). Toutefois, certaines analyses de la fonction rénale que nous avons effectuées soulignent des perturbations de la filtration glomérulaire. Une diminution du DFG est observée dans de nombreuses pathologies associées à des lésions tubulaires. Dès lors, des hypothèses existent pour tenter d'expliquer la relation entre ces deux phénomènes. Parmi les explications possibles, nous pouvons citer l'obstruction tubulaire, la vasoconstriction des artérioles afférentes se produisant en réponse au feedback tubuloglomérulaire, ou encore le développement d'une inflammation qui auront des répercussions sur le flux sanguin et donc sur le débit de filtration (Basile et al., 2012). Après des mois d'intoxication aux AA, il devient possible d'observer des signes de glomérulosclérose survenant ultérieurement aux perturbations tubulaires, comme l'ont montré des biopsies de reins humains (Kazama et al., 2004) (Hong et al., 2006).

L'analyse histologique des coupes rénales a également permis de constater que l'intensité des lésions tubulaires induites par les AA est atténuée dans le groupe AA + L-Arg. Une fois de plus, le score de nécrose obtenu par notre laboratoire a permis de valider ces résultats (Martin, Master BBMC 2013-2014, UNamur), de même que les concentrations

urinaires en NAG qui sont significativement réduites. Cette amélioration de la structure rénale grâce à une administration de L-Arg a été constatée par d'autres chercheurs dans différents modèles de néphropathie. En effet, la plupart d'entre eux ont intoxiqué des rats avec de la cyclosporine et ont constaté que les reins présentaient moins de lésions et étaient moins atrophiés lorsqu'un traitement à la L-Arg était administré (Mansour et al., 2002) (Kurus et al., 2005).

En conditions normales, une atteinte rénale s'accompagne d'une prolifération cellulaire qui a pour but de réparer les zones lésées. Afin d'évaluer la prolifération cellulaire dans notre modèle murin de NAA, nous avons analysé l'expression protéique de PCNA au niveau de l'interstitium et au niveau des tubules rénaux. Ce cofacteur de la polymérase est un élément essentiel de la machinerie de réplication de l'ADN. De plus, il intervient dans les phénomènes de recombinaison et de réparation des dommages subis par l'ADN. Le PCNA est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et donc la prolifération des cellules (Kelman, 1997) (Maga and Hubscher, 2003). Un marquage par immunohistochimie nous a permis de constater qu'une intoxication aux AA stimule de façon significative l'expression de PCNA au niveau des tubules et de l'interstitium. Notre modèle montre donc bien l'existence d'une tentative de réparation tissulaire importante induite par les AA. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres modèles expérimentaux de NAA chez la souris et le rat (Pozdzik et al., 2008) (Baudoux et al., 2012). Pozdzik et al. (2008) ont constaté que chez des rats atteints de NAA, les tissus rénaux présentent une augmentation de l'expression de PCNA au sein des cellules tubulaires proximales du segment S3, et ce déjà après 24h d'intoxication aux AA. De plus, cette expression tubulaire diminue au fur et à mesure que la maladie progresse. Ce phénomène peut s'expliquer par la formation d'adduits d'ADN avec les AA qui perturbent la réparation de l'ADN et induisent une prolifération cellulaire insuffisante. Ceci conduit alors au développement d'une atrophie tubulaire au niveau de laquelle l'expression de PCNA est fortement réduite. Ce cofacteur de la polymérase devient alors majoritairement localisé dans les cellules de l'interstitium, comme ont pu l'observer Pozdzik et al. (2008) après 35 jours d'intoxication aux AA. Il est intéressant de signaler que l'expression de PCNA induite par les AA est plus faible que celle stimulée lors d'une intoxication par un quelconque antibiotique (Yang et al., 2007). Cette faible régénération peut être considérée comme un des facteurs impliqués dans la progression de la NAA qui persiste même après l'arrêt de l'intoxication. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différences au niveau de l'expression de PCNA entre les groupes AA et les groupes AA + L-Arg. Ceci suggère un maintien de la régénération entre les groupes AA et AA + L-Arg, comme il a déjà été reporté dans notre laboratoire (Martin, Master BBMC 2013-2014, UNamur).

Des lésions cellulaires sont généralement suivies d'une accumulation progressive de cellules inflammatoires (Basile et al., 2012). Dès lors, nous avons entrepris de compter le nombre de macrophages situés dans les reins des souris et nous avons pu constater qu'après 4 jours d'intoxication aux AA, aucune différence significative n'est détectable entre les différents groupes expérimentaux. Nous avons toutefois remarqué que les concentrations urinaires en MCP-1 étaient significativement plus importantes en cas d'intoxication aux AA. Cette chémokine est impliquée dans le recrutement des macrophages sur les sites d'inflammation. De tels résultats étaient attendus, car au cours des premiers jours de la maladie, très peu de cellules inflammatoires peuvent être observées. Le nombre de macrophages varie fortement d'une souris à l'autre, ce qui explique qu'une différence significative entre les groupes est difficilement observable. Pozdzik et al. (2010) et Baudoux et al. (2012) sont arrivés aux mêmes conclusions en ce qui concerne l'inflammation. Ce n'est qu'à partir du 7^{ème} jour après l'intoxication aux AA qu'ils ont pu observer des macrophages et ont constaté que ces cellules

étaient localisées dans l'interstitium à proximité des tubules nécrotiques afin de phagocyter les débris cellulaires. Cette étape est importante pour promouvoir le processus de réparation tissulaire (Ricardo et al., 2008). Il a également été rapporté que les macrophages et les lymphocytes T sont plus abondants que les neutrophiles et les polymorphonucléaires éosinophiles en cas de NAA (Pozdzik et al., 2010) (Baudoux et al., 2012). De plus, aucun effet de la L-Arg sur l'infiltration des macrophages n'a été mis en évidence à la suite de cette courte phase de néphropathie aiguë aux AA. Il est probable que des effets de ce traitement soient observables durant une phase plus tardive de la maladie. C'est ce que laissent penser de nombreuses recherches effectuées sur des cas de néphropathie. En effet, depuis 1995, des études ont montré que le NO module l'expression de MCP-1 et l'activité des macrophages via la voie de signalisation qui dépend de NF- κ B (Zeihner et al., 1995).

A la suite de cette première partie de notre travail, nous pouvons conclure que notre modèle de NAA aiguë est similaire à ceux que l'on retrouve dans la littérature. En effet, les intoxications aux AA ont induit une nécrose tubulaire aiguë qui a eu des répercussions sur la fonction rénale. Parmi ces perturbations, nous pouvons citer une protéinurie massive, une glycosurie, une augmentation de la FE_{Na} et de la diurèse qui reflètent des troubles de la réabsorption tubulaire. Simultanément, des tentatives de régénération tissulaire sont mises en place mais ne sont pas suffisantes pour rétablir la fonction rénale. La NAA s'accompagne également de l'accumulation de cellules inflammatoires impliquées dans le développement d'un stress oxydatif. Ce dernier a pu être mis en évidence précédemment dans notre laboratoire à l'aide de mesures des concentrations en H_2O_2 plasmatique et urinaire qui augmentent en cas de NAA. Un infiltrat inflammatoire et un stress oxydatif ont été associés à la progression de diverses maladies, notamment des atteintes rénales (Basile et al., 2012). Une des conséquences de leur persistance est le développement d'une ischémie tissulaire (Lameire and Vanholder, 2004). La première partie du mémoire nous a également permis de constater qu'une augmentation de la biodisponibilité en NO permettait d'atténuer les lésions tubulaires induites par les AA et ainsi améliorer le DFG et la réabsorption tubulaire.

2. Etude de l'ischémie rénale

Afin d'analyser l'impact d'une intoxication aux AA sur l'éventuel développement d'une ischémie rénale toxique, nous avons étudié certains facteurs qui sont connus pour être associés à des conditions d'hypoperfusion (Basile et al., 2012). Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur la synthèse du NO et avons analysé l'expression et l'activité des NOS. Par la suite, nous avons tenté de caractériser le compartiment vasculaire et enfin évaluer l'hypoxie rénale. Pour évaluer la réponse tissulaire à l'hypoxie, nous avons étudié l'expression de HIF et du VEGF.

Comme indiqué précédemment, notre étude nous a permis de constater qu'une intoxication aux AA induit une diminution significative de la biodisponibilité du NO. Des perturbations dans la production de cet important vasodilatateur ont été constatées dans de nombreuses maladies rénales, qu'elles soient aiguës ou chroniques (Goligorsky et al., 2002) (Baylis, 2008). Différents facteurs peuvent être à l'origine d'une telle diminution de la biodisponibilité du NO, à savoir un stress oxydatif ou une insuffisance en L-Arg qui est le substrat des NOS. Une augmentation des inhibiteurs endogènes des NOS ou une diminution de l'activité de ces synthases peuvent également réduire la biodisponibilité du NO (Baylis, 2006).

Dès lors, nous avons tenté de tester ces différentes hypothèses. Premièrement, des études effectuées sur des cellules des tubules proximaux humains ont montré que lorsque ces cellules étaient incubées avec 90 μM de AA, un stress oxydatif se développait (Chen et al., 2010). Ce dernier peut donc être un des acteurs à l'origine d'une diminution du NO. En second lieu, nous avons pu constater qu'une administration de L-Arg en cas de NAA permettait d'augmenter l'excrétion des métabolites du NO qui devenait alors similaire à celle des souris contrôles. Il est donc possible d'imaginer qu'au cours de la NAA, il existe une insuffisance en substrat des NOS. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'en conditions normales, la majorité de la L-Arg filtrée par les glomérules est réabsorbée par les tubules (Brosnan and Brosnan, 2004). Or, une intoxication aux AA induit des lésions sévères des cellules tubulaires, perturbant ainsi la réabsorption rénale, notamment celle de la L-Arg. Les souris contrôles, pour qui la réabsorption tubulaire est efficace, devraient donc présenter des concentrations en L-Arg endogènes suffisantes. Ceci pourrait expliquer le fait que l'excrétion des métabolites du NO est la même dans les groupes contrôle et contrôle + L-Arg. Il est utile de signaler qu'une insuffisance en substrat peut engendrer le découplage de la eNOS qui synthétise alors des radicaux libres et accentue le stress oxydatif (Forstermann, 2010).

Afin d'étudier plus en détail les causes d'une diminution de la biodisponibilité en NO dans notre modèle de NAA, nous avons analysé l'expression génique de la eNOS et de la iNOS grâce à une qRT-PCR. Aucune différence significative n'a été détectée entre les différents groupes expérimentaux. Dans le but d'analyser l'expression protéique, nous avons effectué des Western Blot et avons marqué par immunohistochimie la eNOS et la peNOS, cette dernière correspondant à la forme activée de la eNOS. Malheureusement, nos nombreuses tentatives ont été infructueuses et nous n'avons pas été en mesure de générer des résultats interprétables. Nous pouvons toutefois signaler que les informations récoltées dans la littérature ont montré que les insuffisances rénales aiguës s'accompagnaient bien souvent d'un déséquilibre de l'activité des différentes NOS (Peresleni et al., 1996) (Goligorsky et al., 2002). En effet, l'expression de la iNOS est généralement augmentée, tandis que celle de la eNOS est diminuée. Pour rappel, le NO libéré par la iNOS a un rôle cytotoxique, notamment dû à sa capacité à former du peroxynitrite en se liant à l'anion superoxyde (Wink et al., 1991). La eNOS, quant à elle, synthétise du NO qui joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité du réseau vasculaire. Des études réalisées sur des souris C57BL/6 knock-out pour la eNOS ont montré une détérioration plus importante de la fonction rénale après un épisode d'ischémie-reperfusion (Yamasowa et al., 2005). A l'avenir, il serait intéressant que nous réalisions de nouvelles études de l'activité des NOS, dans le but de déterminer si un tel déséquilibre au niveau de la eNOS et de la iNOS existe en cas de NAA. Nous pourrions, par exemple, réaliser un dosage utilisant de la L-Arg radioactive. Le principe d'un tel dosage se base sur la conversion de la L-Arg en L-citrulline par les NOS, pour ensuite analyser la radioactivité émise par la L-citrulline (Kameya and Asano, 2014). Ceci pourrait nous permettre d'observer des différences entre les groupes expérimentaux au niveau de l'activité des NOS, particulièrement lors d'un traitement à la L-Arg qui est censé stimuler cette activité (Forstermann and Sessa, 2012).

Des perturbations de la production du NO dans les maladies rénales sont souvent le reflet d'un dysfonctionnement de l'endothélium (Goligorsky et al., 2002). Dès lors, nous avons entrepris de caractériser le compartiment vasculaire dans notre modèle de NAA aiguë via l'immunomarquage de l'isolectine B4. Nos résultats ne nous ont pas permis d'observer de différences significatives entre les groupes expérimentaux concernant le nombre de vaisseaux intra-rénaux. La littérature indique que les insuffisances rénales s'accompagnent toujours de perturbations des cellules endothéliales conduisant à la perte progressive des capillaires péri-tubulaires (Choi et al., 2000) (Goligorsky et al., 2002). Toutefois, lorsque l'on analyse ce

phénomène de plus près, il est possible de constater que de telles atteintes vasculaires ne sont généralement visibles que lorsque le rein est en souffrance depuis au moins une semaine. Yuan et al. (2003), par exemple, ont étudié les changements subis par des reins de souris lors d'une intoxication à l'acide folique dans des concentrations induisant une sévère néphrotoxicité. Après un et trois jours d'intoxication, une étude de l'expression de PECAM (Platelet endothelial cell adhesion molecule) localisée au niveau des capillaires rénaux n'a pas montrée de différence avec les souris contrôles. Cependant, au 14^{ème} jour, cette expression était significativement réduite (Yuan et al., 2003). Ces différents cas de néphropathie laissent penser qu'au début de l'insuffisance rénale, les cellules endothéliales maintiennent une certaine capacité de régénération qui disparaît peu à peu avec la progression de la maladie. C'est du moins ce que suggèrent Ohashi et al. (2002) qui ont analysé des cellules endothéliales en souffrance et ont observé, au fil des semaines, une disparition progressive des cellules exprimant le KI 67, un marqueur de la prolifération cellulaire (Ohashi et al., 2002). Il est donc compréhensible que dans notre modèle de NAA aiguë les perturbations vasculaires soient difficilement détectables. Par ailleurs, des effets d'une augmentation de NO sur la densité des vaisseaux sanguins sont difficilement détectables après aussi peu de jours d'atteinte rénale (Basile et al., 2003).

Une analyse supplémentaire effectuée dans le cadre de ce mémoire a consisté en l'évaluation de l'hypoxie intra-rénale après une intoxication aux AA. En premier lieu, nous avons tenté d'analyser la distribution du pimonidazole dans les reins des souris. Ce composé injecté aux souris par voie intrapéritonéale avant le sacrifice a été distribué dans tous les organes, mais son activation a uniquement eu lieu dans les cellules en hypoxie, au niveau desquelles il a pu former des adduits covalents stables avec les protéines. Les résultats obtenus à la suite du marquage par immunohistochimie de ces adduits sont difficilement interprétables. En effet, le marquage s'est avéré être très peu spécifique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les anticorps primaires fournis par le kit venaient de souris, ce qui a induit une importante fixation non spécifique des anticorps secondaires. De plus, le transport du pimonidazole peut être perturbé par de nombreux facteurs tels que des atteintes de l'endothélium ou des dérèglements du flux sanguin qui induiraient une mauvaise distribution de cette molécule, rendant ainsi le marquage non représentatif de la véritable tension en oxygène tissulaire.

Dès lors, nous avons entrepris d'analyser l'expression protéique et génique de HIF-1 α et HIF-2 α . Pour rappel, il s'agit de deux isoformes de HIF, un facteur de transcription synthétisé en permanence et dégradé en normoxie. Celui-ci contient deux sous-unités, une α sensible à l'oxygène et une β qui est constitutive. HIF-1 α est principalement exprimé dans les tubules et dans l'interstitium, HIF-2 α est, quant à lui, spécifique des cellules endothéliales, glomérulaires et des fibroblastes. Afin d'étudier l'expression protéique de HIF-1 α et HIF-2 α , des Western Blot ont été réalisés. Une fois de plus, les nombreuses tentatives réalisées n'ont pas permis de générer des résultats pouvant être analysés. Par ailleurs, nous avons marqué HIF-1 α par immunofluorescence et n'avons pas pu constater de différences significatives entre les différents groupes expérimentaux. De plus, une analyse de l'expression génique de HIF-1 α et de HIF-2 α à la suite d'une qRT-PCR n'a, elle non plus, pas montré d'effets des AA ou de la L-Arg. De tels résultats ne nous permettent pas de confirmer nos hypothèses. Pourtant, des recherches effectuées sur des rats intoxiqués au cisplatine ont montré qu'en moins d'une semaine, l'expression de HIF-1 α et de HIF-2 α était fortement stimulée (Tanaka et al., 2005). Toutefois, dans d'autres études menées sur des rats qui ont ingéré 20 mg/kg de AA, une accumulation de HIF-1 α n'était visible qu'après 8 jours d'intoxications (Wen et al., 2008). Une telle discordance peut s'expliquer par une différence au niveau de l'agent toxique ou encore au niveau des voies d'administration de ces acides. Notons toutefois qu'il serait utile d'effectuer de nouvelles analyses protéiques des HIF dans notre modèle, notamment à la suite de Western

Blot par fluorescence, afin de vérifier les résultats que nous avons obtenus. De plus, des études réalisées sur des reins de rats ayant subi un épisode d'ischémie-reperfusion ont montré qu'en moins de 24h, le NO pouvait induire une stabilité des HIF, protégeant ainsi le rein contre la progression des lésions (Mahfoudh-Boussaid et al., 2012). En effet, les HIF sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire, dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse, le tonus vasculaire ou encore le métabolisme du glucose. Une de leurs cibles est le VEGF, un facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse (Haase, 2012).

Afin de poursuivre notre étude et d'analyser l'implication potentielle des AA dans une ischémie tissulaire, nous avons analysé l'expression du VEGF. Ce facteur de croissance est synthétisé en cas de perturbation du flux sanguin et va se lier aux cellules endothéliales afin de stimuler l'angiogenèse ou encore augmenter la perméabilité vasculaire. L'analyse de son expression protéique à la suite d'un Western Blot n'a de nouveau généré aucun résultat et l'étude de l'expression génique n'a pas montré de différence entre les groupes expérimentaux. Dans la littérature, il est possible de voir que les atteintes rénales s'accompagnent généralement d'une stimulation de la synthèse du VEGF par les cellules tubulaires, qui va agir au niveau des vaisseaux afin de stimuler leur croissance (Basile et al., 2012). Toutefois, dans certaines pathologies, le VEGF qui devrait être augmenté est plutôt produit dans des concentrations insuffisantes. En effet, des études ont montré qu'en cas de NAA, la synthèse de VEGF peut être réduite. Wen et al. (2008) l'ont montré sur des rats intoxiqués pendant 4 jours (*per os*, 20 mg/kg), Yang et al. (2007) l'ont observé sur des biopsies rénales de patients atteints de NAA depuis des mois. Cette insuffisance en VEGF est généralement associée à la disparition progressive des vaisseaux et est suivie d'une irrigation insuffisante des tissus rénaux dont la régénération est alors réduite. De plus, le VEGF est impliqué dans la synthèse du NO via la phosphorylation de la eNOS. Une production plus faible de ce facteur de croissance pourrait donc accentuer la déficience en NO et le déséquilibre entre la eNOS et la iNOS. Simultanément, le NO est impliqué dans la régulation de l'expression du VEGF (Forstermann and Sessa, 2012). Ces résultats ont également été observés par Papapetropoulos et al. (1997) qui ont effectué leurs recherches sur des cellules endothéliales en culture. Une fois encore, nous pourrions envisager de réaliser un dosage des concentrations en VEGF intra-rénal, notamment l'aide d'un kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) qui détecte et quantifie les protéines à la suite d'une reconnaissance avec des anticorps primaires et secondaires.

Pour conclure cette seconde partie, nous constatons que, dans notre modèle de NAA, nous n'avons pu détecter qu'une seule des caractéristiques propres à l'ischémie tissulaire. En effet, nous avons pu constater que les AA induisent une diminution de la biodisponibilité de NO qui est un vasodilatateur important. Nous avons supposé que ce phénomène pourrait être associé à une insuffisance de substrat pour les NOS, ou encore au développement d'un stress oxydatif. En ce qui concerne le compartiment vasculaire, aucune différence n'a pu être observée lors d'une intoxication aux AA. Rappelons toutefois que ce dernier paramètre peut être dû au fait que la NAA en est encore à un stade précoce, et que des perturbations sévères des vaisseaux pourraient être observables un peu plus tardivement. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions étudier l'expression d'autres marqueurs des cellules endothéliales, ou encore poursuivre nos analyses durant 6 à 7 jours après une intoxication aux AA. Cependant, concernant l'expression des HIF et du VEGF, nous nous attendions à une augmentation du premier et une diminution du deuxième comme l'ont constaté Tanaka et al. (2005) ainsi que Wen et al. (2008). En effet, une insuffisance en VEGF est généralement associée à une disparition progressive des capillaires, ce qui aggrave les lésions tissulaires (Yang et al., 2007). Pour y faire face, les cellules stimulent la synthèse des facteurs HIF qui permettent une meilleure survie cellulaire. Rappelons toutefois que Tanaka et al. (2005) ont utilisé une

molécule toxique autre que les AA, à savoir du cisplatine. De plus, dans le cas de Wen et al. (2008), l'administration des AA était différente, les doses étaient plus importantes et le protocole a duré plus longtemps. Toutes ses disparités sont probablement à l'origine des résultats différents que nous avons obtenus en terme d'hypoxie.

3. Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons pu reproduire au sein de notre laboratoire un modèle murin de NAA aiguë qui présente les mêmes caractéristiques que celles rapportées dans la littérature. En effet, les souris qui ont reçu des injections de AA ont développé une nécrose tubulaire aiguë induisant une insuffisance rénale avec des troubles de la réabsorption tubulaire. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés au NO, étant donné que la biodisponibilité de ce vasodilatateur est réduite en cas de NAA. Nous avons pu constater qu'un traitement à la L-Arg permettait d'augmenter cette biodisponibilité chez les souris atteintes de NAA et était associé à une atténuation de l'insuffisance rénale. En effet, les lésions tubulaires induites par les AA étaient réduites et une amélioration a été observée au niveau du DFG et de la réabsorption tubulaire.

Toutefois, nous n'avons pas été en mesure d'associer notre modèle de NAA au développement d'une ischémie rénale toxique. En effet, aucune différence n'a été observée au niveau du nombre de vaisseaux intra-rénaux, ni au niveau de l'expression des HIF et du VEGF. De plus, concernant le NO, ce messager cellulaire agit aussi bien sur le VEGF que sur les HIF et stimule leur synthèse (Papapetropoulos et al., 1997) (Yuan et al., 2003). Il peut donc induire une protection de la microcirculation rénale qui est associée à une amélioration de nombreux cas d'insuffisance rénale. C'est ce phénomène que nous avons tenté d'associer à notre modèle de NAA. En poursuivant nos études, nous pourrions mettre en évidence l'impact positif qu'exerce le NO sur le système vasculaire, ce qui expliquerait la diminution des lésions tubulaires que nous avons constatée dans le groupe AA + L-Arg, ainsi que l'amélioration du DFG et de la réabsorption tubulaire.

Afin d'approfondir notre étude, différentes perspectives peuvent être envisagées. Tout d'abord, pour la caractérisation de l'impact des AA sur l'ischémie tissulaire, nous pourrions analyser d'autres marqueurs du compartiment vasculaire tels que ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), P et E-sélectine ainsi que CX₃CL1 (fractalkine). Ces molécules sont exprimées par les cellules endothéliales en cas de lésion tissulaire et interviennent dans le recrutement des leucocytes (Kelly et al., 1994) (Fuller et al., 2001). Il serait donc intéressant d'évaluer leur expression en cas de NAA. Une autre analyse que nous pourrions effectuer est l'étude de l'expression de Sirt-1, une protéine déacétylase NAD-dépendante. Cette protéine est intéressante car elle protège les tubules proximaux contre le stress oxydatif et est impliquée dans la réponse à l'hypoxie (Funk et al., 2010) (Shoag and Arany, 2010). En effet, des études effectuées sur des souris intoxiquées au cisplatine ont montré qu'une surexpression de Sirt-1 réduisait les lésions rénales (Hasegawa et al., 2010).

Pour mieux comprendre l'impact d'un déséquilibre entre les molécules vasoactives dans la NAA, nous pourrions administrer aux souris du sodium nitroprusside plutôt que de la L-Arg. Le premier est un donneur direct de NO, tandis que la L-Arg sert de substrat pour les NOS afin d'induire la synthèse du NO. A ce jour, peu d'études utilisent cette molécule. Nous pouvons

toutefois mentionner les recherches de Gupta et al. (2007) qui ont observé une amélioration de la fonction rénale chez des rats souffrant de néphrotoxicité induite par du nitrilotriacétate (Gupta et al., 2007). Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer le rôle d'un vasoconstricteur comme l'endothéline (ET-1) dans la NAA. En effet, une surexpression de cette molécule a été observée dans des cas de NAA (Wen et al., 2008). De plus, une administration d'antagonistes des récepteurs à l'ET-1 a été associée à une diminution de la fibrose rénale et une meilleure survie de souris atteintes d'hypertension (Boffa et al., 2001). Nous pourrions donc administrer aux souris une molécule telle que le bosentan et analyser l'impact de l'inhibition des effets de l'ET-1 sur la progression de la NAA.

L'intérêt des études comme celle réalisée au cours de ce mémoire est d'analyser les mécanismes physiopathologiques qui caractérisent une maladie afin d'identifier les moyens de défense des organes contre une agression. Nous pouvons ainsi comprendre à quel moment la réparation tissulaire et les tentatives de régénération cessent et la phase chronique s'installe, avec le développement d'une fibrose. Dans cette optique, il serait intéressant d'analyser l'évolution de l'expression de marqueurs de prolifération durant la NAA. En plus de PCNA, nous pouvons citer notamment le HB-EGF (Heparine binding Epidermal growth factor) qui est exprimé dans les tubules proximaux et activé en cas de lésions tissulaire (Sakai et al., 1997). De plus, le BMP-7 (Bone morphogenetic protein 7) est impliqué dans la prolifération cellulaire et a été associé à une diminution des lésions rénales lors d'une IRA causée par une ischémie (Vukicevic et al., 1998).

Bibliographie

- Alheid, U., J.C. Frolich, and U. Forstermann. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thrombosis research*. 47:561-571.
- Andrew, P.J., and B. Mayer. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*. 43:521-531.
- Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton. 2012. Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*. 2:1303-1353.
- Basile, D.P., D.L. Donohoe, K. Roethe, and D.L. Mattson. 2003. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. *American journal of physiology. Renal physiology*. 284:F338-348.
- Baudoux, T.E., A.A. Pozdzik, V.M. Arlt, E.G. De Prez, M.H. Antoine, N. Quellard, J.M. Goujon, and J.L. Nortier. 2012. Probenecid prevents acute tubular necrosis in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. *Kidney international*. 82:1105-1113.
- Baylis, C. 2006. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nature clinical practice. Nephrology*. 2:209-220.
- Baylis, C. 2008. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology*. 294:F1-9.
- Boffa, J.J., P.L. Tharaux, J.C. Dussaule, and C. Chatziantoniou. 2001. Regression of renal vascular fibrosis by endothelin receptor antagonism. *Hypertension*. 37:490-496.
- Bredt, D.S. 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free radical research*. 31:577-596.
- Brezis, M., and S. Rosen. 1995. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *The New England journal of medicine*. 332:647-655.
- Brosnan, M.E., and J.T. Brosnan. 2004. Renal arginine metabolism. *The Journal of nutrition*. 134:2791S-2795S; discussion 2796S-2797S.
- Burckhardt, G., and N.A. Wolff. 2000. Structure of renal organic anion and cation transporters. *American journal of physiology. Renal physiology*. 278:F853-866.
- Chan, W., and Z. Cai. 2008. Aristolochic acid induced changes in the metabolic profile of rat urine. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 46:757-762.
- Chan, W., K.C. Lee, N. Liu, and Z. Cai. 2007. A sensitivity enhanced high-performance liquid chromatography fluorescence method for the detection of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acid in herbal medicines. *Journal of chromatography. A*. 1164:113-119.
- Chen, Y.Y., J.G. Chung, H.C. Wu, D.T. Bau, K.Y. Wu, S.T. Kao, C.Y. Hsiang, T.Y. Ho, and S.Y. Chiang. 2010. Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. *Oncology reports*. 24:141-153.

- Choi, Y.J., S. Chakraborty, V. Nguyen, C. Nguyen, B.K. Kim, S.I. Shim, W.N. Suki, and L.D. Truong. 2000. Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. *Human pathology*. 31:1491-1497.
- Cosyns, J.P., J.P. Dehoux, Y. Guiot, R.M. Goebbels, A. Robert, A.M. Bernard, and C. van Ypersele de Strihou. 2001. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney international*. 59:2164-2173.
- Cosyns, J.P., M. Jadoul, J.P. Squifflet, P.J. Van Cangh, and C. van Ypersele de Strihou. 1994. Urothelial malignancy in nephropathy due to Chinese herbs. *Lancet*. 344:188.
- Cronin, A.J., G. Maidment, T. Cook, G.C. Kite, M.S. Simmonds, C.D. Pusey, and G.M. Lord. 2002. Aristolochic acid as a causative factor in a case of Chinese herbal nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 17:524-525.
- Cui, M., Z.H. Liu, Q. Qiu, H. Li, and L.S. Li. 2005. Tumour induction in rats following exposure to short-term high dose aristolochic acid I. *Mutagenesis*. 20:45-49.
- Debelle, F.D., J.L. Nortier, E.G. De Prez, C.H. Garbar, A.R. Vienne, I.J. Salmon, M.M. Deschodt-Lanckman, and J.L. Vanherweghem. 2002. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 13:431-436.
- Debelle, F.D., J.L. Vanherweghem, and J.L. Nortier. 2008. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney international*. 74:158-169.
- Depierreux, M., B. Van Damme, K. Vanden Houte, and J.L. Vanherweghem. 1994. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 24:172-180.
- Diamond, J.R., and T.L. Pallone. 1994. Acute interstitial nephritis following use of tung shueh pills. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 24:219-221.
- Dickman, K.G., D.H. Sweet, R. Bonala, T. Ray, and A. Wu. 2011. Physiological and molecular characterization of aristolochic acid transport by the kidney. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 338:588-597.
- Dong, H., N. Suzuki, M.C. Torres, R.R. Bonala, F. Johnson, A.P. Grollman, and S. Shibutani. 2006. Quantitative determination of aristolochic acid-derived DNA adducts in rats using 32P-postlabeling/polyacrylamide gel electrophoresis analysis. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 34:1122-1127.
- Fleming, I., and R. Busse. 1999. NO: the primary EDRF. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 31:5-14.

- Fleming, I., and R. Busse. 2003. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 284:R1-12.
- Forstermann, U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 459:923-939.
- Forstermann, U., E.I. Closs, J.S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, and H. Kleinert. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 23:1121-1131.
- Forstermann, U., and W.C. Sessa. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 33:829-837, 837a-837d.
- Fuller, T.F., B. Sattler, L. Binder, F. Vetterlein, B. Ringe, and T. Lorf. 2001. Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts by a soluble P-selectin glycoprotein ligand. *Transplantation*. 72:216-222.
- Funk, J.A., S. Odejinmi, and R.G. Schnellmann. 2010. SRT1720 induces mitochondrial biogenesis and rescues mitochondrial function after oxidant injury in renal proximal tubule cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 333:593-601.
- Futrakul, N., P. Tohsukhowong, S. Patumraj, P. Siriviriyakuk, N. Tipprukmas, and P. Futrakul. 2003. Treatments of hemodynamic maladjustment and oxidative stress prevent renal disease progression in chronically severe glomerulonephritides. *Renal failure*. 25:839-844.
- Garcia-Cardena, G., R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos, and W.C. Sessa. 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*. 392:821-824.
- Goligorsky, M.S., S.V. Brodsky, and E. Noiri. 2002. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney international*. 61:855-861.
- Gudi, T., G.K. Hong, A.B. Vaandrager, S.M. Lohmann, and R.B. Pilz. 1999. Nitric oxide and cGMP regulate gene expression in neuronal and glial cells by activating type II cGMP-dependent protein kinase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 13:2143-2152.
- Gupta, A., V. Chander, S. Sharma, and K. Chopra. 2007. Sodium nitroprusside and L-arginine attenuates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal injury in rats. *Toxicology*. 232:183-191.
- Haase, V.H. 2012. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of kidney fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*. 5:S16.
- Hasegawa, K., S. Wakino, K. Yoshioka, S. Tatematsu, Y. Hara, H. Minakuchi, K. Sueyasu, N. Washida, H. Tokuyama, M. Tzukunft, K. Skorecki, K. Hayashi, and H. Itoh. 2010. Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against acute kidney injury by retaining peroxisome function. *The Journal of biological chemistry*. 285:13045-13056.

- Heddlestone, J.M., Z. Li, J.D. Lathia, S. Bao, A.B. Hjelmeland, and J.N. Rich. 2010. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *British journal of cancer*. 102:789-795.
- Hong, Y.T., L.S. Fu, L.H. Chung, S.C. Hung, Y.T. Huang, and C.S. Chi. 2006. Fanconi's syndrome, interstitial fibrosis and renal failure by aristolochic acid in Chinese herbs. *Pediatric nephrology*. 21:577-579.
- Hsin, Y.H., C.H. Cheng, J.T. Tzen, M.J. Wu, K.H. Shu, and H.C. Chen. 2006. Effect of aristolochic acid on intracellular calcium concentration and its links with apoptosis in renal tubular cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 11:2167-2177.
- Huang, L., A. Scarpellini, M. Funck, E.A. Verderio, and T.S. Johnson. 2013a. Development of a chronic kidney disease model in C57BL/6 mice with relevance to human pathology. *Nephron extra*. 3:12-29.
- Huang, T.C., S.M. Chen, Y.C. Li, and J.A. Lee. 2013b. Urinary d-lactate levels reflect renal function in aristolochic acid-induced nephropathy in mice. *Biomedical chromatography : BMC*. 27:1100-1106.
- Izumotani, T., E. Ishimura, K. Tsumura, K. Goto, Y. Nishizawa, and H. Morii. 1993. An adult case of Fanconi syndrome due to a mixture of Chinese crude drugs. *Nephron*. 65:137-140.
- Jacob, L. 2007. L'insuffisance rénale aiguë. *Springer*, 2^e édition
- Jelakovic, B., J. Nikolic, Z. Radovanovic, J. Nortier, J.P. Cosyns, A.P. Grollman, N. Basic-Jukic, M. Belicza, D. Bukvic, S. Cavaljuga, D. Cvoriscec, A. Cvitkovic, Z. Dika, P. Dimitrov, L. Dukanovic, K. Edwards, D. Ferluga, L. Fustar-Preradovic, G. Gluhovschi, G. Imamovic, T. Jakovina, P. Kes, N. Leko, Z. Medverec, E. Mesic, M. Miletic-Medved, F. Miller, N. Pavlovic, J. Pasini, S. Plestina, M. Polenakovic, V. Stefanovic, K. Tomic, S. Trnacevic, I. Vukovic Lela, and R. Stern-Padovan. 2013. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*.
- Kabanda, A., M. Jadoul, R. Lauwerys, A. Bernard, and C. van Ypersele de Strihou. 1995. Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney international*. 48:1571-1576.
- Kameya, M., and Y. Asano. 2014. Rapid enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection. *Enzyme and microbial technology*. 57:36-41.
- Kazama, I., M. Matsubara, M. Michimata, M. Suzuki, R. Hatano, H. Sato, and S. Ito. 2004. Adult onset Fanconi syndrome: extensive tubulo-interstitial lesions and glomerulopathy in the early stage of Chinese herbs nephropathy. *Clinical and experimental nephrology*. 8:283-287.

- Kelly, K.J., W.W. Williams, Jr., R.B. Colvin, and J.V. Bonventre. 1994. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:812-816.
- Kelman, Z. 1997. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*. 14:629-640.
- Krumbiegel, G., J. Hallensleben, W.H. Mennicke, N. Rittmann, and H.J. Roth. 1987. Studies on the metabolism of aristolochic acids I and II. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 17:981-991.
- Kurus, M., M. Esrefoglu, A. Bay, and F. Ozturk. 2005. Protective effect of oral L-arginine supplementation on cyclosporine induced nephropathy in rats. *International urology and nephrology*. 37:587-594.
- Lameire, N.H., and R. Vanholder. 2004. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*. 18:21-36.
- Lebeau, C., F.D. DeBelle, V.M. Arlt, A. Pozdzik, E.G. De Prez, D.H. Phillips, M.M. Deschodt-Lanckman, J.L. Vanherweghem, and J.L. Nortier. 2005. Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 20:2321-2332.
- Lee, K.S., D.K. Lee, D. Jeoung, H. Lee, J. Choe, K.S. Ha, M.H. Won, Y.G. Kwon, and Y.M. Kim. 2012. Differential effects of substrate-analogue inhibitors on nitric oxide synthase dimerization. *Biochemical and biophysical research communications*. 418:49-55.
- Liu, M.C., S. Maruyama, M. Mizuno, Y. Morita, S. Hanaki, Y. Yuzawa, and S. Matsuo. 2003. The nephrotoxicity of *Aristolochia manshuriensis* in rats is attributable to its aristolochic acids. *Clinical and experimental nephrology*. 7:186-194.
- Maga, G., and U. Hubscher. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*. 116:3051-3060.
- Mahfoudh-Boussaid, A., M.A. Zaouali, K. Hadj-Ayed, A.H. Miled, D. Saidane-Mosbahi, J. Rosello-Catafau, and H. Ben Abdennebi. 2012. Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1alpha in ischemic kidney: the role of nitric oxide. *Journal of biomedical science*. 19:7.
- Mansour, M., M.H. Daba, A. Gado, A. Al-Rikabi, and A. Al-Majed. 2002. Protective effect of L-arginine against nephrotoxicity induced by cyclosporine in normal rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 45:441-446.
- Mengs, U. 1983. On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid. *Archives of toxicology*. 52:209-220.
- Mount, P.F., and D.A. Power. 2006. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta physiologica*. 187:433-446.

- Nangaku, M. 2006. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 17:17-25.
- Nathan, C.F., and J.B. Hibbs, Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current opinion in immunology*. 3:65-70.
- Ng, Y.Y., S. Yu, T.W. Chen, S.C. Wu, A.H. Yang, and W.C. Yang. 1998. Interstitial renal fibrosis in a young woman: association with a Chinese preparation given for irregular menses. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 13:2115-2117.
- Nortier, J.L., M.M. Deschodt-Lanckman, S. Simon, N.O. Thielemans, E.G. de Prez, M.F. Depierreux, C.L. Tielemans, C. Richard, R.R. Lauwerys, A.M. Bernard, and J.L. Vanherweghem. 1997. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney international*. 51:288-293.
- Nortier, J.L., H.H. Schmeiser, M.C. Muniz Martinez, V.M. Arlt, C. Vervae, C.H. Garbar, P. Daelemans, and J.L. Vanherweghem. 2003. Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 18:426-428.
- Nortier, J.L., and J.L. Vanherweghem. 2002. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *Toxicology*. 181-182:577-580.
- Ohashi, R., A. Shimizu, Y. Masuda, H. Kitamura, M. Ishizaki, Y. Sugisaki, and N. Yamanaka. 2002. Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 13:1795-1805.
- Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, J.A. Madri, and W.C. Sessa. 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 100:3131-3139.
- Peresleni, T., E. Noiri, W.F. Bahou, and M.S. Goligorsky. 1996. Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *The American journal of physiology*. 270:F971-977.
- Peters, G., and P.R. Hedwall. 1963. Aristolochic Acid Intoxication: A New Type of Impairment of Urinary Concentrating Ability. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. 145:334-355.
- Pitts, R.F. 1976. Physiologie du rein et du milieu extérieur. *Masson 2^e édition*
- Pozdzik, A.A., A. Berton, H.H. Schmeiser, W. Missoum, C. Decaestecker, I.J. Salmon, J.L. Vanherweghem, and J.L. Nortier. 2010. Aristolochic acid nephropathy revisited: a place for innate and adaptive immunity? *Histopathology*. 56:449-463.

- Pozdzik, A.A., I.J. Salmon, F.D. DeBelle, C. Decaestecker, C. Van den Branden, D. Verbeelen, M.M. Deschodt-Lanckman, J.L. Vanherweghem, and J.L. Nortier. 2008. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney international*. 73:595-607.
- Rabelink, T.J., D.C. Wijewickrama, and E.J. de Koning. 2007. Peritubular endothelium: the Achilles heel of the kidney? *Kidney international*. 72:926-930.
- Reginster, F., M. Jadoul, and C. van Ypersele de Strihou. 1997. Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 12:81-86.
- Ricardo, S.D., H. van Goor, and A.A. Eddy. 2008. Macrophage diversity in renal injury and repair. *The Journal of clinical investigation*. 118:3522-3530.
- Sakai, M., M. Zhang, T. Homma, B. Garrick, J.A. Abraham, J.A. McKanna, and R.C. Harris. 1997. Production of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in the early phase of regeneration after acute renal injury. Isolation and localization of bioactive molecules. *The Journal of clinical investigation*. 99:2128-2138.
- Sato, N., D. Takahashi, S.M. Chen, R. Tsuchiya, T. Mukoyama, S. Yamagata, M. Ogawa, M. Yoshida, S. Kondo, N. Satoh, and S. Ueda. 2004. Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 56:221-229.
- Schmeiser, H.H., K.B. Schoepe, and M. Wiessler. 1988. DNA adduct formation of aristolochic acid I and II in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 9:297-303.
- Shesely, E.G., N. Maeda, H.S. Kim, K.M. Desai, J.H. Krege, V.E. Laubach, P.A. Sherman, W.C. Sessa, and O. Smithies. 1996. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:13176-13181.
- Shibutani, S., R.R. Bonala, T. Rosenquist, R. Rieger, N. Suzuki, F. Johnson, F. Miller, and A.P. Grollman. 2010. Detoxification of aristolochic acid I by O-demethylation: less nephrotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid Ia in rodents. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 127:1021-1027.
- Shibutani, S., H. Dong, N. Suzuki, S. Ueda, F. Miller, and A.P. Grollman. 2007. Selective toxicity of aristolochic acids I and II. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 35:1217-1222.
- Shoag, J., and Z. Arany. 2010. Regulation of hypoxia-inducible genes by PGC-1 alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 30:662-666.
- Simoes, M.L., S.L. Hockley, T. Schwerdtle, G.G. da Costa, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, and V.M. Arlt. 2008. Gene expression profiles modulated by the human carcinogen aristolochic acid I in human cancer cells and their dependence on TP53. *Toxicology and applied pharmacology*. 232:86-98.

- Skalova, S. 2005. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta medica*. 48:75-80.
- Steinert, J.R., T. Chernova, and I.D. Forsythe. 2010. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 16:435-452.
- Stevens, A., and J. Lowe. 1997. Histologie humaine. *DeBoeck Université*.
- Stiborova, M., E. Frei, V.M. Arlt, and H.H. Schmeiser. 2008a. Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Mutation research*. 658:55-67.
- Stiborova, M., E. Frei, and H.H. Schmeiser. 2008b. Biotransformation enzymes in development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid. *Kidney international*. 73:1209-1211.
- Sun, D., Y. Wang, C. Liu, X. Zhou, X. Li, and A. Xiao. 2012. Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Life sciences*. 90:900-909.
- Sutton, T.A. 2009. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvascular research*. 77:4-7.
- Tanaka, T., I. Kojima, T. Ohse, R. Inagi, T. Miyata, J.R. Ingelfinger, T. Fujita, and M. Nangaku. 2005. Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity. *American journal of physiology. Renal physiology*. 289:F1123-1133.
- Thum, T., D. Fraccarollo, M. Schultheiss, S. Froese, P. Galuppo, J.D. Widder, D. Tsikas, G. Ertl, and J. Bauersachs. 2007. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*. 56:666-674.
- Tisher, C.C. and B.B. Brenner. 1994. Development and gross anatomy of the kidney. *Renal pathology : with clinical and functional correlations*. J.B. Lippincott Company
- Tottrup, A., D. Svane, and A. Forman. 1991. Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *The American journal of physiology*. 260:G385-389.
- Vanherweghem, J.L., M. Depierreux, C. Tielemans, D. Abramowicz, M. Dratwa, M. Jadoul, C. Richard, D. Vandervelde, D. Verbeelen, R. Vanhaelen-Fastre, and et al. 1993. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*. 341:387-391.
- Vukicevic, S., V. Basic, D. Rogic, N. Basic, M.S. Shih, A. Shepard, D. Jin, B. Dattatreymurthy, W. Jones, H. Dorai, S. Ryan, D. Griffiths, J. Maliakal, M. Jelic, M. Pastorcic, A. Stavljenic, and T.K. Sampath. 1998. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *The Journal of clinical investigation*. 102:202-214.

- Wen, Y.J., L. Qu, and X.M. Li. 2008. Ischemic injury underlies the pathogenesis of aristolochic acid-induced acute kidney injury. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 152:38-46.
- Wink, D.A., K.S. Kasprzak, C.M. Maragos, R.K. Elespuru, M. Misra, T.M. Dunams, T.A. Cebula, W.H. Koch, A.W. Andrews, J.S. Allen, and et al. 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*. 254:1001-1003.
- Yamasowa, H., S. Shimizu, T. Inoue, M. Takaoka, and Y. Matsumura. 2005. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 312:153-159.
- Yang, L., X. Li, and H. Wang. 2007. Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 22:445-456.
- Yeh, Y.H., Y.T. Lee, H.S. Hsieh, and D.F. Hwang. 2008. Short-term toxicity of aristolochic acid, aristolochic acid-I and aristolochic acid-II in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 46:1157-1163.
- Yuan, H.T., X.Z. Li, J.E. Pitera, D.A. Long, and A.S. Woolf. 2003. Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha. *The American journal of pathology*. 163:2289-2301.
- Zeicher, A.M., B. Fisslthaler, B. Schray-Utz, and R. Busse. 1995. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circulation research*. 76:980-986.
- Zhang, X., H. Wu, P. Liao, X. Li, J. Ni, and F. Pei. 2006. NMR-based metabonomic study on the subacute toxicity of aristolochic acid in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 44:1006-1014.
- Zhou, L., and D.Y. Zhu. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 20:223-230.